

DER EINFLUSS DER MILZ
AUF DAS WACHSTUM VON TUMOREN
IN MÄUSELINIEN
MIT UNTERSCHIEDLICHER MILZGRÖSSE

Hubertus von Wallenberg Pachaly

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0070

AUS DEM INSTITUT FÜR CHIRURGISCHE FORSCHUNG DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

(Vorstand: Prof.Dr.Dr.h.c.W.Brendel)

DER EINFLUSS DER MILZ AUF DAS WACHSTUM VON TUMOREN IN MÄUSELINIEN
MIT UNTERSCHIEDLICHER MILZGRÖSSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hubertus von Wallenberg Pachaly
aus
Stuttgart-Bad Cannstatt

München 1981

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.Dr.med.vet.C.Hammer

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.Dr.h.c.W.Brendel

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.3.1982....



MEINEM

VATER

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. E I N L E I T U N G	1
B. M A T E R I A L U N D M E T H O D I K	3
I. M A T E R I A L	3
1. T i e r e	3
a. Mäuse mit genetisch bedingt	3
unterschiedlichem Milzgewicht	
b. Genetisch bedingt milzlose Mäuse	6
2. Tumoren	6
a. B ₁₆ -Melanom	6
b. Harding-Passey-Melanom	7
c. Aufbereitung der Tumoren	7
II. M E T H O D I K	8
1. In vivo-Versuche	8
1.1. Splenektomie ohne Tumorgabe	8
a. Versuchsaufbau	8
1.2. Splenektomie mit Tumorgabe	8
a. Versuchsaufbau (Splenektomie + B ₁₆ -Melanom)	9
b. Versuchsaufbau (Splenektomie + H.P.-Melanom) ...	9
1.3. Transfer von Milz-Lymphozyten	10
a. Präparation der Lymphozyten	10
b. Versuchsaufbau	11
1.4. Transfer von Thymus-Lymphozyten	12
a. Präparation der Lymphozyten	12
b. Versuchsaufbau	13
1.5. Untersuchung der Milz	14
a. Milzgewicht	14
b. Histologie	14
1.6. Tumorinzidenz bei genetisch	14
bedingt milzlosen Mäusen	
a. Versuchsaufbau	14
b. Bestimmung der Leukozyten	15

2.	In vitro-Versuche	16
2.1.	Direkte Immunfluoreszenz	16
a.	Gewinnung der Lymphozyten	16
b.	Markierung der Lymphozyten	17
c.	Quantitative Bestimmung der B-Lymphozyten	17
2.2.	Trypan-Blau-Färbung	18
3.	Statistische Berechnungen	18
C.	E R G E B N I S S E	19
1.	In vivo-Versuche	19
1.1.	Splenektomie ohne Tumorgabe	19
1.2.	Splenektomie mit Tumorgabe	23
a.	Splenektomie + B ₁₆ -Melanom	23
b.	Splenektomie + H.P.-Melanom	31
1.3.	Transfer von Milz-Lymphozyten	37
1.4.	Transfer von Thymus-Lymphozyten	44
1.5.	Untersuchung der Milz	48
a.	Milzgewicht	48
b.	Histologie der Milz	49
1.6.	Tumorinzidenz bei genetisch bedingt milzlosen Mäusen	51
a.	B ₁₆ -Melanom	51
b.	Harding-Passey-Melanom	53
2.	In vitro-Versuche	56
2.1.	Direkte Immunfluoreszenz	56
a.	Splenektomie + H.P.-Melanom	56
b.	Splenektomie + B ₁₆ -Melanom	57
c.	Milzlose Mäuse (B ₁₆ -Melanom)	59
D.	D I S K U S S I O N	60
	Funktion des Immunsystems	60
	Funktion der Milz	63
	Tumorimmunologie	64

1.	In vivo-Versuche	68
1.1.	Splenektomie ohne Tumorgabe	68
1.2.	Splenektomie mit Tumorgabe	70
1.3.	Transfer von Milz-Lymphozyten	74
1.4.	Transfer von Thymus-Lymphozyten	75
1.5.	Untersuchung der Milz	78
1.6.	Tumorinzidenz bei genetisch	79
	bedingt milzlosen Mäusen	
2.	In vitro-Versuche	80
2.1.	Direkte Immunfluoreszenz	80
E.	ZUSAMMENFASSUNG	82
F.	LITERATURVERZEICHNIS	85

A. EINLEITUNG

Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß die Milz möglicherweise einen bedeutenden Einfluß auf Entstehung und Wachstum von Tumoren ausübt, da sie über eine große Zahl von Zellen verfügt, die an der Regulierung der Immunantwort beteiligt sind. In klinischen Untersuchungen (69, 97, 106) konnte Tumorextirpation in Verbindung mit Splenektomie bzw. Milzextirpation bei Leukämie-Patienten die Prognose in vielen Fällen verbessern. Splenektomie inhibiert auch im Tiermodell die Inzidenz und das Wachstum transplantabler Tumoren (20,36,105,125,134) bzw. reduziert das Auftreten von Metastasen (96), wobei der Effekt der Splenektomie auch von der inoculierten Tumordosis abhängen kann (20, 103). In anderen Publikationen hingegen wurde das Tumorstadium durch die Milzextirpation nicht beeinflusst (58). Eine weitere Aufgabe der Milz ist, das sogenannte "trapping" von Lymphozyten in tumordrainierenden Lymphknoten zu regulieren (41). Cytotoxische Lymphozyten werden in vitro von Splenektomierter Tumorträger nicht in dem Maße inhibiert wie von Splenektomierter Tiere mit Milz (37, 63). Hingegen erkranken splenektomierte Patienten häufiger an Infektionen (56, 79), wofür vor allem ein erniedrigter IgM-Spiegel verantwortlich gemacht wird (17). Dies wird im Tierversuch bestätigt (24); andererseits fand man jedoch auch eine erhöhte Resistenz splenektomierter Mäuse gegenüber Listerien-Infektionen (124).

Bei Carcinom-Patienten ist häufig generell die Immunantwort supprimiert, was sich in einer abgeschwächten oder ausbleibenden Reaktion vom Spättyp nach Hauttestung bzw. in einer inhibierten Lymphozytenproliferation nach Gabe von T-Zell-Mitogen plus Antigen zeigt (8, 51). Für diese Immunsuppression werden beim Menschen (68, 102) und bei Tieren (4, 109) neben sogenannten "enhancing antibodies" auch Suppressorzellen verantwortlich gemacht. Suppressorzellen sollen ebenfalls bei Patienten, die an Hypogammaglobulinämien leiden, die Synthese humoraler Antikörper

unterdrücken (131), und beim Morbus Hodgkin-Patienten die "mixed lymphocyte reaction" (MLR) inhibieren (130).

Hierbei erhebt sich die Frage, ob die Milz als größtes lymphatisches Organ allein humorale Funktion im Sinne von "Tumor-Enhancement" ausübt oder auch in der Lage ist, auf zellulärer Basis über suppressive Mechanismen das Tumorstadium zu begünstigen (108).

Daher sollte in vorliegender Arbeit untersucht werden,

1. inwieweit das Auftreten von Tumoren bei Mäusen durch Splenektomie beeinflusst wird,
2. ob der Transfer von Tumorantigen-spezifisch sensibilisierten Lymphozyten aus der Milz und aus dem Thymus von Mäusen, die denselben Tumor tragen, einen "Enhancement"-Effekt auf das Tumorstadium ausübt und
3. wenn dies zutreffen sollte, durch welche Zellen dieser "Enhancement"-Effekt verursacht wird.

Die Versuche wurden an Mäusen durchgeführt, die sich durch entsprechende Zucht signifikant in ihrem Milzgewicht unterscheiden (93). Aufgrund ihres Phagozytosevermögens konnten Tiere mit großer Milz (Hohe Linie) und Mäuse mit kleiner Milz (Niedere Linie) herangezüchtet werden. Diese Tiere scheinen deswegen für die Untersuchungen besonders geeignet, da Mäuse mit angeborenem höheren Milzgewicht eine erhöhte Inzidenz an spontanen Mamma-Carcinomen zeigten und auch 3,4-Benzpyren-induzierte Tumoren gehäuft in der hohen Linie auftraten (94). Für vorliegende Versuche wurden zwei transplantable Mäusetumoren verwendet - das B₁₆-Melanom und das Harding-Passey-Melanom.

B. MATERIAL UND METHODIK

I. Material

1. Tiere

a. Mäuse mit genetisch bedingt unterschiedlichem Milzgewicht

Die Versuchstiere stammen aus dem Tierlabor des Lehr- und Versuchsgutes der Tierärztlichen Fakultät in Oberschleißheim. Es sind Mäuse der F 27-Linien, welche auf hohes bzw. niedriges Tuscheausscheidungsvermögen selektiert sind. Im folgenden ist zum näheren Verständnis die Zucht der Mäuse beschrieben (81):

"Zum Aufbau eines möglichst heterogenen Zuchttiermaterials werden über zwei Generationen Kreuzungen zwischen Nachkommen der laboreigenen Auszuchtpopulation (Pop), dem laboreigenen B/a-Inzuchtstamm (F 29) und dem CBA/J-Inzuchtstamm durchgeführt. In der Ausgangspopulation stehen 126 im Phagozytosevermögen getestete Mäuse für die Selektion zur Verfügung... Pro Linie werden 20 Mäuse (10♂ + 10♀♀) selektiert und monogam gepaart. In den Folgegenerationen werden innerhalb der Familien je eine Tochter und ein Sohn mit der höchsten Tuscheausscheidungsrate (Hohe Linie) bzw. mit der niedrigsten Tuscheausscheidungsrate (Niedere Linie) selektiert. Innerhalb der Linien wird nach Zufall gepaart. Dabei wird zur Vermeidung eines zu schnellen Anstiegs des Inzuchtgrades darauf geachtet, daß keiner der Paarlinge einen identischen Großelter hat..... Die Kontrollgruppe des Selektionsversuches wird aus der F₁-Nachkommenschaft der Hohen und Niederen Linie aufgebaut. Mit jeweils fünf Söhnen und Töchtern der Hohen und Niederen Linie werden nach Zufall reziproke Paarungen durchgeführt (monogam). Auf diese Weise sind alle Familien der Ausgangspopulation mit je einem Nachkommen in der Kontrolle vertreten. In den weiteren Generationen erfolgte die Weiterzucht mit zehn Familien nach Zufallspaarung...

Das Phagozytosevermögen des mononukleären Systems gegenüber kolloidaler Tusche wird anhand des Tuscheausscheidungstestes nach Biozzi (12) ermittelt. Die Tuschekonzentration beträgt 16 mg/100g Lebendgewicht (92). Für jede Maus wird der Phagozytoseindex Kr (=negativer Regressionskoeffizient der logarithmierten Tuschekonzentration auf die Zeit) berechnet. Die Höhe des Kr-Wertes ist das einzige Selektionskriterium."

Schon nach drei Generationen Selektion war das unterschiedliche Phagozytosevermögen der Hohen und der Niederen Linie signifikant. Meyer (93) stellte fest, daß der Phagozytoseindex Kr mit dem Leber-, vor allem aber mit dem Milzgewicht korrelierte, d.h. daß Mäuse mit hohem Tuscheausscheidungsvermögen eine große Milz, Mäuse mit geringem Tuscheausscheidungsvermögen eine kleine Milz besaßen. Bis zur F 12 wurde selektiert; in den weiteren acht Generationen bis zur F 20 wurde nicht mehr selektiert, aber nach dem beschriebenen System weitergezüchtet, wobei sich zeigte, daß der Unterschied hinsichtlich des Milzgewichtes zwischen beiden Linien weiterhin signifikant blieb (Abb. 1).

Zucht und Aufzucht der Versuchstiere erfolgte in desinfizierten Holzkäfigen. Der Bestand war frei von Ekto- und Endoparasiten und folgenden Bakterien: Salmonellen, Pasteurella multocida, Pasteurella pseudotuberculosis, Listeria monocytogenes, Erysipelothrix rhusiopathiae und Bordetella (haemophilus) bronchiseptica. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ 3 angeliefert, die Akklimatisationszeit betrug ca. 1 Woche im zentralen Tierlabor des Instituts.

Während der Experimente wurden die Tiere in Makrolonkäfigen Typ 3 (6 Tiere pro Käfig) in Barrierenhaltung auf behandeltem Sägemehl als Einstreu gehalten. Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit waren geregelt (22^o C bzw. 55 + 5% relative Luftfeuchte), Kunstlichtbeleuchtung im 12/12h Rhythmus. Die Tiere wurden nach 14 Tagen Adaptionszeit an die Versuchsbedingungen erstmals in den Versuch genommen. Wasser und Futter wurden ad libitum angeboten, wobei 20

mm Pellets Altromin Standarddiät für Mäuse⁺ und unbehandeltes Leitungswasser verwendet wurden. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere 35-40g schwer, 70-100 Tage alt und in der 27. Generation nach Selektionsbeginn.

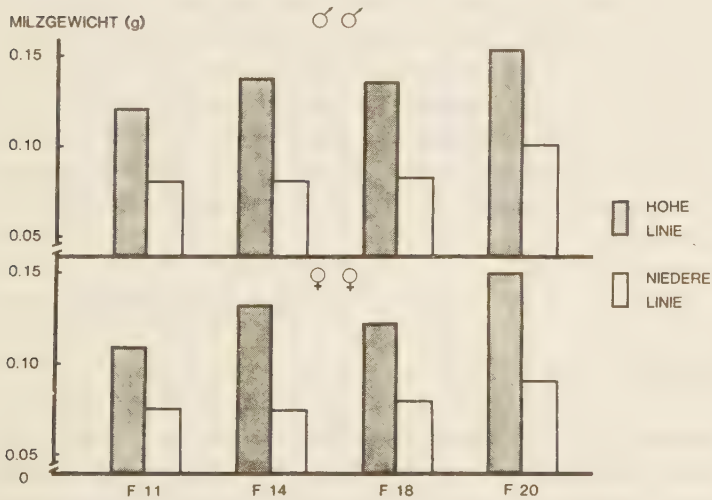


Abb. 1 Generationsmittelwerte für das Milzgewicht in F 11 (mit Selektion) und F 14, F 18, F 20 (ohne Selektion) modifiziert nach Meyer (93)

⁺Firma Altrogge Spezialfutterwerk GmbH

b. Genetisch bedingt milzlose Mäuse

Die Tiere stammen aus dem U.T. Memorial Research Center, wo durch Bruder - Schwester-Paarung ein Inzuchtstamm von Mäusen, die von Geburt an milzlos sind, selektiert worden war (86). Diese milzlosen Mäuse sind gleichzeitig heterozygot (Dh/+) dominant für eine Hemimelie (Verkümmerung der Glieder) der unteren Extremität. Weiterhin zeigen sie Anomalien des Magen-Darm -und Urogenitaltraktes. Untersuchungen (86) zeigten, daß ca. 12% dieser Mäuse an einer Hydronephrose mit Megaureter leiden. 68% der Tiere haben einen kleineren bzw. atrophischen Magen und einen kürzeren Gastrointestinaltrakt durch Fehlen von Dünn- oder Dickdarmteilen. Wegen dieser Anomalien sterben ca. 10% der Tiere in den ersten drei Wochen. Die milzlosen Mäuse wiegen ca. 15-25% weniger als normale Mäuse; dies ist vor allem bei den männlichen Tieren zu beobachten.

2. Tumoren

a. B₁₆ -Melanom

Das Mäusemelanom B₁₆ entstand - spontan auftretend - 1954 bei einer C57BL/6J-Maus¹⁶ (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine 1962). Seitdem wurde es durch Transplantation auf C57BL-Mäuse erhalten und ist das häufigst benutzte Melanom in der experimentellen Tumorforschung an der Maus. Der Tumor zeigt keine spontane Rückbildung, infiltriert schnell in das umliegende Gewebe, ob subcutan, intramuskulär oder intraperitoneal inoculiert. Die Metastasierung erfolgt hauptsächlich in die Lunge (40). Die Zellverdopplungszeit soll 1.5 Tage betragen (67), die sich jedoch mit zunehmender Metastasenzahl verlängert (28). Der Tumor soll eine spezifische Antigenstruktur besitzen, da cytotoxische Splenocyten selektiv gegen ihn induziert werden konnten (132). Schimming und Erfle beschreiben spezifische Antikörper, die eventuell virusin-

duziert sein könnten (121), da das B₁₆-Melanom Partikel enthält, die Eigenschaften von RNA-Tumorviren¹⁶ haben (60).

b. Harding-Passey-Melanom (H.P.-Melanom)

Das H.P.-Melanom wurde am linken Ohr einer braunen nichtin-gezüchteten Maus unbekannter Linie im Laboratorium von Dr. R.A. Passey der Leeds University Medical School (England 1925) ent-deckt (30). Der Tumor wächst langsamer und nicht so infiltrierend wie das B₁₆-Melanom, eine Metastasierung durch das Melanom ist nicht beschrieben worden. Die Zellverdopplungszeit soll zwei Tage betragen (67). Spezifische Antikörper gegen das H.P.-Melanom konnten durch Immunisierung von Kaninchen induziert werden (30).

c. Aufbereitung der Tumoren

Sowohl das B₁₆ -, als auch das Harding-Passey-Melanom wurde von tumortragenden Mäusen unter sterilen Kautelen entnommen. Der so-lide Tumor wurde von Bindegewebe und Fett befreit, in Hank'scher Lösung⁺ gewaschen und anschließend mechanisch zerkleinert. Die so hergestellten Einzelzellsuspensionen wurden 3x bei 275 x g über 5 min. gewaschen, um dann in einer Neubauer-Zählkammer gezählt zu werden. Die Anzahl der Zellen wurde so eingestellt, daß immer die gewünschte Tumorzellzahl pro 0.2 ml Inoculum vorlag.

⁺Apotheke, Universitätsklinik München

II. Methodik

1. In vivo-Versuche

1.1. Splenektomie ohne Tumorgabe

Insgesamt wurden 55 weibliche Tiere (s.Tab.1) splenektomiert (Sx). Die Tiere wurden mit Äther kurz betäubt, um dann mit Choralhydrat⁺ (25mg/100g KG intraperitoneal) narkotisiert zu werden. Die Tiere atmeten spontan. Mittels Medianschnitt wurde das Abdomen eröffnet und die Milz freigelegt. Hierbei traten im Gegensatz zum Rippenbogenrandschnitt nur geringe Blutungen auf. Arteria und Vena lienalis wurden mit einem bipolaren Elektrokauter koaguliert. Anschließend⁺⁺ wurde das Abdomen durch zwei Einzelknopfnähte verschlossen.

61 weibliche Mäuse dienten als Kontrollen (Ko), sie wurden nicht laparatomiert.

a. Versuchsaufbau

Tabelle 1 zeigt die Gruppeneinteilung:

Tabelle 1:	Hohe Linie		Niedere Linie	
	Sx	Ko	Sx	Ko
Anzahl der Tiere/Gruppe	28	35	27	26

1.2 Splenektomie mit Tumorgabe

Insgesamt wurden dafür 139 Mäuse wie beschrieben splenektomiert und 127 Kontrolltiere scheinoperiert. Dazu wurden diese laparatomiert, die Milz zunächst freigelegt, um anschließend wieder in ihre ursprüngliche Position gebracht zu werden.

⁺Apotheke, Universitätsklinik München, ⁺⁺4/OEthiflex, F.Ethicon

a. Versuchsaufbau (Splenektomie + B₁₆-Melanom)

Alle Tiere erhielten am Operationstag 2.5×10^6 B₁₆-Melanom-Zellen in 0.2 ml Hank'scher Lösung i.m. in den rechten Hinterlauf injiziert.

Tabelle 2 zeigt die Gruppeneinteilung:

Tabelle 2:	Hohe Linie				Niedere Linie			
	♂		♀		♂		♀	
	Sx	Ko	Sx	Ko	Sx	Ko	Sx	Ko
Anzahl der Tiere/Gruppe	25	19	22	20	23	19	25	23

Die Tiere wurden jeden zweiten Tag in kurzer Äthernarkose auf ihr Tumorstadium untersucht. Durch Palpation der Inoculationsstelle konnte schon frühzeitig ein eventuelles Auftreten der Tumoren festgestellt werden. Am 28. postoperativen Tag wurden alle Tiere entblutet, axilläre, inguinale und paraaortale Lymphknoten entfernt und das Tumorgewicht bestimmt. Die Milz wurde gewogen und anschließend zusammen mit den Lymphknoten mittels direkter Immunfluoreszenz weiter untersucht.

b. Versuchsaufbau (Splenektomie + H.P.-Melanom)

Alle Tiere erhielten am Operationstag 1.5×10^6 H.P.-Melanom-Zellen in 0.2 ml Hank'scher Lösung i.m. in den rechten Hinterlauf injiziert. Der weitere Versuchsablauf entspricht oben erwähntem.

Tabelle 3 zeigt die Gruppeneinteilung:

Tabelle 3:	Hohe Linie				Niedere Linie			
	♂		♀		♂		♀	
	Sx	Ko	Sx	Ko	Sx	Ko	Sx	Ko
Anzahl der	13	11	11	13	10	13	10	9
Tiere/Gruppe								

1.3 Transfer von Milz-Lymphozyten

Männliche Mäuse der hohen und niederen Linie erhielten am Tag0 (s.Abb.2) 5×10^5 B₁₆-Melanom-Zellen in 0.2 ml Hank'scher Lösung i.m. in den rechten Hinterlauf injiziert.

a. Präparation der Lymphozyten

Vier Tage nach Inoculation (Tag 4) wurde eine Hälfte der so sensibilisierten Tiere entblutet; die andere Hälfte zehn Tage nach Sensibilisierung (Tag 10). Die steril entnommene Milz wurde in Hank'scher Lösung mechanisch zerkleinert. Die Einzelzellsuspensionen wurden über 3 ml Ficoll-Isopaque⁺-Gradienten (D_{Ficoll} = 1.077) geschichtet und 15 min. lang bei 1500 x g zentrifugiert. Dabei werden die Erythrozyten abzentrifugiert, die Lymphozyten hingegen reichern sich selektiv aufgrund ihrer geringeren Dichte als weißer "Ring" am Übergang Hank'scher Lösung-Ficoll ab. Diese Lymphozytensuspensionen im Ring wurden abpipettiert, 3x bei 275 x g in Hank'scher Lösung gewaschen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellzahl wurde so eingestellt, daß immer die gewünschte Anzahl Lymphozyten pro 0.2 ml Inoculum vorlag.

⁺ Apotheke, Universitätsklinik München

b. Versuchsaufbau

Jedes Versuchstier erhielt intraperitoneal (i.p.) 6×10^5 sensibilisierte Lymphozyten und 7.5×10^5 B₁₆-Melanom-Zellen, jeweils in 0.2 ml Hank'scher Lösung, i.m. in den rechten Hinterlauf injiziert. Entsprechende Kontrolltiere erhielten 6×10^5 Lymphozyten von unbehandelten Mäusen, die Tumordosis war identisch. Dabei wurde darauf geachtet, daß Spender und Empfänger jeweils derselben Linie angehörten.

Abb. 2 zeigt noch einmal zusammenfassend die Vorbereitung und den Ablauf des Transferversuches.

SENSIBILISIERUNG DER LYMPHOZYTENSPENDER MIT B16-MELANOM

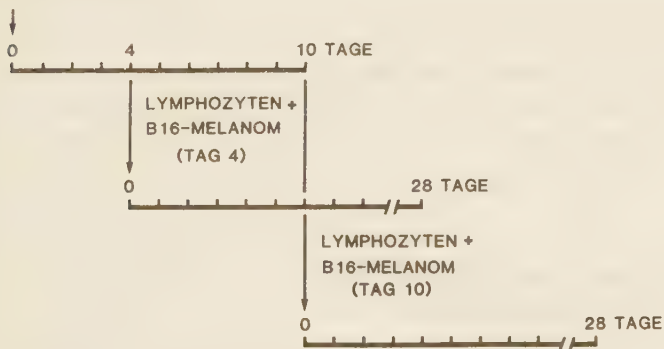


Abb. 2 Versuchsschema: Lymphozyten-Transfer

Tabelle 4 zeigt die Gruppeneinteilung (Transferversuch am Tag 4):

Tabelle 4:	Hohe Linie		Niedere Linie	
	-----		-----	
	sens. Ly.+B ₁₆	Ko-Ly+B ₁₆	sens. Ly.+B ₁₆	Ko-Ly+B ₁₆
Anzahl der	17	12	15	12
Tiere/Gruppe				

Tabelle 5 zeigt die Gruppeneinteilung (Transferversuch am Tag 10)

Tabelle 5:	Hohe Linie		Niedere Linie	
	-----		-----	
	sens. Ly.+B ₁₆	Ko-Ly+B ₁₆	sens. Ly.+B ₁₆	Ko-Ly+B ₁₆
Anzahl der	22	14	20	15
Tiere/Gruppe				

Bei allen Tieren wurde jeden zweiten Tag in kurzer Äthernarkose das Tumorwachstum kontrolliert. Die Mäuse der hohen Linie in Tabelle 4 wurden nach 14 Tagen, alle anderen Tiere nach 28 Tagen getötet.

1.4 Transfer von Thymus-Lymphozyten

a. Präparation der Lymphozyten

Fünf Tage nach Inoculation (s. 1.3) wurden die Tiere entblutet. Die anschließende Gewinnung der Lymphozyten aus dem Thymus erfolgte analog der Milzpräparation. Durch Waschen in Hank'scher Lösung ist der Thymus fast frei von Erythrozyten, so daß diese nicht mehr von den Lymphozyten getrennt werden müssen.

b. Versuchsaufbau

Die Mäuse der hohen Linie waren zuchtbedingt ausschließlich männliche Tiere, während die Tiere der niederen Linie männlich und weiblich waren. Jedes Tier erhielt i.p. 4×10^7 sensibilisierte Lymphozyten und i.m. 7.5×10^5 B₁₆-Melanom-Zellen, jeweils in 0.2 ml Hank'scher Lösung injiziert. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Anzahl Lymphozyten von unbehandelten Mäusen, die Tumordosis war identisch. Auch hierbei wurde darauf geachtet, daß Spender und Empfänger jeweils derselben Linie angehörten. Als Referenz diente in der hohen Linie eine weitere Kontrollgruppe, die nur Tumorzellen erhielten, ohne daß Lymphozyten übertragen wurden.

Tabelle 6 zeigt die Gruppeneinteilung (Transferversuch am Tag 5):

Tabelle 6:	Hohe Linie ♂			Niedere Linie			
				♂		♀	
	sens.Ly.	Ko-Ly.	Ko	sens.Ly.	Ko-Ly.	sens.Ly.	Ko-Ly.
	+ B ₁₆	+ B ₁₆	nur B ₁₆	+ B ₁₆	+ B ₁₆	+ B ₁₆	+ B ₁₆
Anzahl d.							
Tiere/	14	13	7	10	9	10	9
Gruppe							

Die Kontrolle des Tumorwachstums erfolgte jeden zweiten Tag in kurzer Äthernarkose; 28 Tage nach Lymphozytentransfer wurde der Versuch abgeschlossen. Aus Milz und Lymphknoten wurden Lymphozytensuspensionen gewonnen, die mittels direkter Immunfluoreszenz auf ihren B-Zellanteil untersucht wurden.

1.5 Untersuchung der Milz

a. Milzgewicht

Die Milz der splenektomierten Tiere wurde am Operationstag (d.h. vor Tumorgabe) gewogen, die Milz der laparatomierten Tiere am 28. postoperativen Tag (d.h. 28 Tage nach Tumorgabe).

b. Histologie

Die Milz männlicher und weiblicher Tiere aus beiden Linien wurde vor und nach Tumorgabe im Pathologischen Institut der Universität München histologisch untersucht.

1.6 Tumorinzidenz bei genetisch bedingt milzlosen Mäusen

a. Versuchsaufbau

Die Tiere erhielten 1×10^6 B₁₆-bzw. 1.4×10^6 H.P.-Melanom-Zellen in 0.2 ml Hank'scher Lösung i.m. in den Rücken, da die Hinterläufe der milzlosen Mäuse durchweg Mißbildungen aufweisen. Als Vergleich dienten Tiere mit hohem bzw. niederem Milzgewicht. Bei allen Mäusen wurde jeden zweiten Tag das Tumorstadium kontrolliert, am 28. Tag nach Tumorgabe wurde der Versuch abgeschlossen. Milz und Lymphknoten wurden auf ihren B-Zellanteil untersucht. Bei den Mäusen, die das H.P.-Melanom erhielten, wurden zusätzlich am 14. und am 28. Tag die Leukozyten im peripheren Blut bestimmt.

Tabelle 7 zeigt die Gruppeneinteilung:

Tabelle 7a:

B -Melanom:
16

	Milzlose Mäuse		Niedere Linie
	♂	♀	♂
Anzahl der Tiere/Gruppe	7	9	5

Tabelle 7b:

H.P.-Melanom

	Milzlose Mäuse		Hohe Linie
	♂		♂ ♀
Anzahl der Tiere/Gruppe	9		6 4

b. Bestimmung der Leukozyten

Die Entnahme des Blutes erfolgte aus der Schwanzvene mit einem Hämatokritröhrchen. Das Blut wurde in eine mit 3% Essigsäure gefüllte Leukozytenpipette aufgenommen und für zwei Minuten auf einem automatischen Schüttler gemischt. Anschließend wurde eine Probemenge in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und die Gesamtzahl der Leukozyten bestimmt. Die Zahl der Leukozyten wurde pro Kubikmillimeter Vollblut angegeben.

2. In vitro-Versuche

2.1 Direkte Immunfluoreszenz

Die prozentuale T- und B-Zellverteilung in Milz und Lymphknoten wurde mittels direkter Immunfluoreszenz untersucht. Die Technik der Immunfluoreszenz beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Im vorliegenden Experiment ist das Antigen ein Immunglobulin der IgG-Fraktion, das nur von B-Lymphozyten produziert wird, der Antikörper ein Kaninchen-anti-Maus Ig-Gammaglobulin, der mit einem Fluorchromat Farbstoff (Fluoreszeinisothiocyanat oder Rhodamin) gekoppelt ist. Dieser Farbstoff fluoresziert, wenn er ultraviolettem Licht der geeigneten Wellenlänge (340 nm) ausgesetzt wird. Werden nun in diesem Fall T- und B-Lymphozyten mit dem Antikörper incubiert, dann bilden IgG-produzierende B-Zellen mit dem fluoreszierenden Antikörper Mikropräzipitate. In einem zweiten Schritt wird die Suspension gewaschen, um überschüssigen, nichtgebundenen markierten Antikörper zu entfernen. Anschließend werden die Lymphozyten unter UV-Licht mikroskopisch betrachtet, wo die B-Lymphozyten markiert sind, da nur sie den spezifischen Antikörper binden können; T-Lymphozyten hingegen fluoreszieren nicht.

a. Gewinnung der Lymphozyten

Milz: Die Gewinnung der Lymphozyten aus der Milz ist oben beschrieben (s. 1.3a).

Lymphknoten: Von jedem Tier wurden axilläre, inguinale und paraaortale Lymphknoten unter dem Mikroskop⁺ von Fett- und Bindegewebe freipräpariert. Aus den Lymphknoten wurden Einzelsuspensionen hergestellt, die anschließend in Hank'scher Lösung bei 275 x g fünf Minuten lang gewaschen wurden. Der Überstand wurde mittels Wasserstrahlpumpe entfernt, das Pellet erneut in Hank'scher Lösung resuspendiert und gewaschen; dies wurde 2x wiederholt.

⁺ 8 fache Vergrößerung, Firma Leitz

b. Markierung der Lymphozyten

Die Lymphozytensuspensionen aus Milz und Lymphknoten wurden in Plastik-Reagenzröhrchen mit 7mm Durchmesser pipettiert. Diese Reagenzgläser wurden 3 min. bei 275 x g zentrifugiert und der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe entfernt. Zu den Pellets wurde ein Tropfen 1:11 verdünntes Kaninchen-anti-Maus-Gammaglobulin, das mit FITC (Fluoreszein-isothiocyanat) markiert war, gegeben. Die Mischung wurde auf einem automatischen Schüttler resuspendiert und 30 min. bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen 3x in Hank'scher Lösung bei 275 x g fünf Minuten lang gewaschen, um überschüssigen, nicht gebundenen, markierten Antikörper zu entfernen. Die Pellets wurden mit einem Tropfen Glycerin/NaCl 1:1 gemischt aufgenommen und auf Objektträger pipettiert, die mit Deckgläschen 24x24 mm bedeckt waren und in einer feuchten Kammer bei 4°C bis zum Ablesen gehalten wurden.

c. Quantitative Bestimmung der B-Lymphozyten

Die Fluoreszenz wurde unter einem Zeiss-Universal-Fotomikroskop im Durchlicht abgelesen. Als Beleuchtungsquelle diente eine Halogenleuchte 12V 100 Watt, für die Exitation wurde ein KP 500 Kurzpaßfilter und ein BG 38 Rotfilter benützt. Das Dunkelfeld wurde mit einem Ölinversionskondensor erzeugt. Abgelesen wurde bei vierzigfacher Vergrößerung mit einem Neofluoar 40,0,75160/0,17 bzw. mit einem Planneofluoar 25,0,8W-Öl. Mit dieser Kombination erhält man eine leuchtende apfelgrüne Fluoreszenz, während der Hintergrund schwarz, nicht fluoreszierendes Material dunkelrot ist.

Dabei wird die Membran der B-Lymphozyten markiert und zeigt häufig ein "capping", die T-Lymphozyten hingegen bleiben dunkelrot. Durch Auszählen von hundert Zellen erhält man den prozentualen Anteil der B-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenpopulation.

⁺IgG Fraktion-Kaninchen-anti-Maus Gammaglobulin, Cappel Laboratories, Dowingtown

2.2. Trypan-Blau-Färbung

Der prozentuale Anteil an lebenden Tumorzellen bzw. Lymphozyten wurde mittels Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Dazu wurden 1 Mikroliter Tumorzell- bzw. Lymphozytensuspension mit 0.5 Mikroliter einer 1%-igen isotonen Trypan-Blau-Lösung⁺ auf einem Objektträger vermischt und mit einem Deckglas (24x24 mm) abgedeckt.

Da tote Zellen nicht in der Lage sind, eingedrungenen Farbstoff aktiv zu eliminieren, färbt sich das Zytoplasma der toten Zellen an, so daß man unter dem Mikroskop⁺⁺ bei 80facher Vergrößerung deren Anteil an der Gesamtzahl der Zellen bestimmen kann. Ca. 80% der Tumorzellen und 90% der Lymphozyten waren vital.

3. Statistische Berechnungen

Zur statistischen Kontrolle der Fehlerbreite diente die Standardabweichung des Mittelwertes SAM ($\bar{x} \pm s_x$). Sind die Ergebnisse zweier Gruppen gegenübergestellt, wurden diese auf Normalverteilung und Varianz untersucht, anschließend wurde die Signifikanz der Aussage auf dem 5%-Niveau durch den t-Test nach Student überprüft. Sind Prozentangaben zweier Gruppen gegenübergestellt, wurde die Signifikanz der Aussage auf dem 5%-Niveau durch den Vierfelder- χ^2 -Test auf Unabhängigkeit oder Homogenität überprüft.

⁺2% Trypan Blau in aqua dest.1:1 mit NaCl 1.8%, scharf abzentrifugiert

⁺⁺Firma Leitz

C. ERGEBNISSE

1. In vivo-Versuche

1.1. Splenektomie ohne Tumorgabe

Vergleicht man die Überlebenszeit der splenektomierten und unbehandelten Mäuse miteinander, so sieht man keine signifikanten Unterschiede in hoher (Abb. 3a) und niederer Linie (Abb. 3b). Das mittlere Lebensalter der splenektomierten Tiere beträgt in der hohen Linie 366 Tage, das der unbehandelten Mäuse 409 Tage. In der niederen Linie werden die splenektomierten Mäuse durchschnittlich 830 Tage, die Kontrolltiere im Schnitt 790 Tage alt.

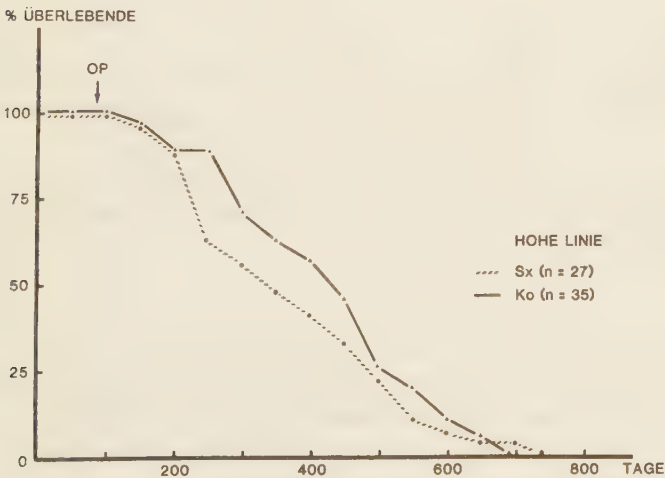


Abb. 3a: Vergleich der Überlebenszeit (ausgedrückt in %) zwischen splenektomierten (Sx) und unbehandelten Mäusen (Ko) der hohen Linie (HL)

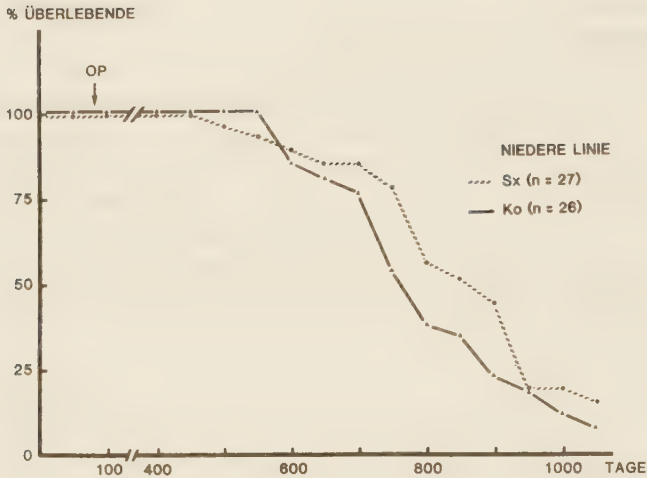


Abb. 3b: Vergleich der Überlebenszeit (ausgedrückt in %) zwischen splenektomierten (Sx) und unbehandelten Mäusen (Ko) der niederen Linie (NL)

Vergleicht man die Überlebenszeit der hohen (HL) und niederen Linie (NL) miteinander, so fällt auf, daß sowohl die splenektomierten (Abb. 4a) als auch die unbehandelten Mäuse (Abb. 4b) mit kleiner Milz eine signifikant höhere Lebenserwartung haben als die entsprechenden Tiere mit großer Milz ($p < 0.001$). Nach 1015 Tagen leben in der niederen Linie noch 15% der splenektomierten und 8% der unbehandelten Tiere, während in der hohen Linie schon nach 705 Tagen alle Mäuse gestorben sind.

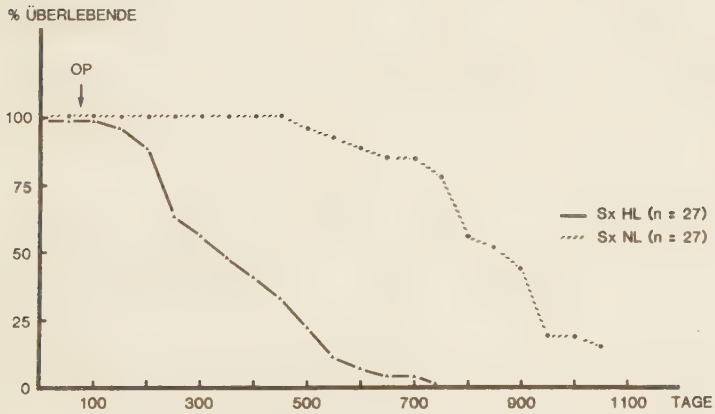


Abb. 4a: Vergleich der Überlebenszeit (ausgedrückt in %) zwischen splenektomierten Mäusen (Sx) der hohen (HL) und niederen Linie (NL)

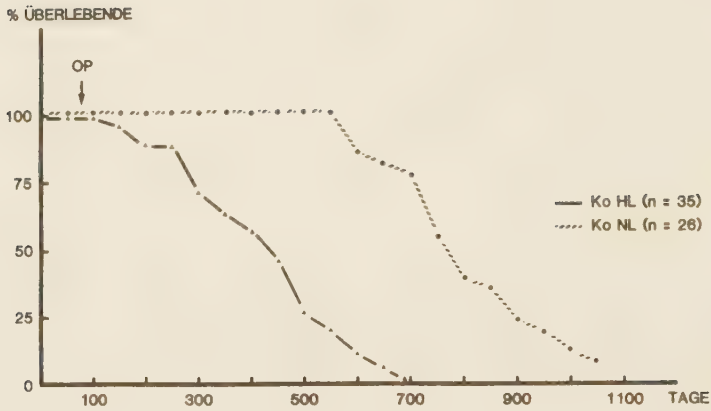


Abb. 4b: Vergleich der Überlebenszeit (ausgedrückt in %) zwischen unbehandelten Mäusen (Ko) der hohen (HL) und niederen Linie (NL)

1.2 Splenektomie mit Tumorgabe

a. Splenektomie + B₁₆-Melanom

Einfluß des Geschlechts auf die Tumorzinzidenz

Die männlichen und weiblichen scheinoperierten Tiere zeigen innerhalb ihrer Linien keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihres Tumorzinzidenz, d.h. über den gesamten Beobachtungszeitraum von vier Wochen ist die Tumorzinzidenz in hoher und niederer Linie jeweils gleich (Abb. 5a + b).

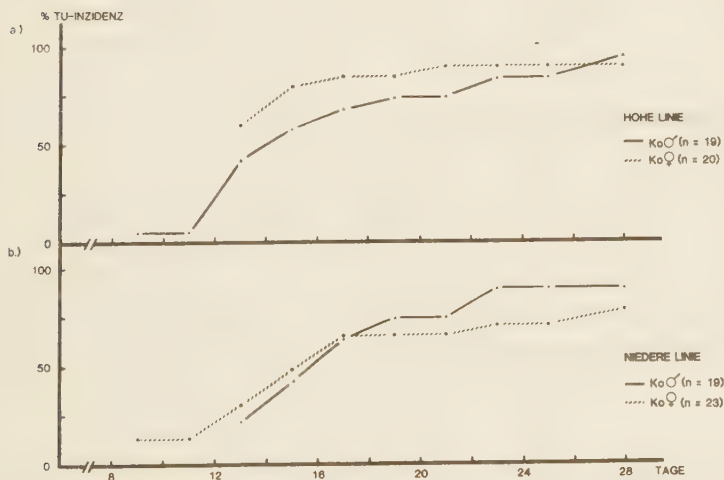


Abb. 5a+b: Tumorzinzidenz (B₁₆-Melanom) bei scheinoperierten Tieren (Ko)
Vgl. männl. Tiere - weibl. Tiere

Hinsichtlich ihrer Tumorangehrate weisen auch die splenektomierten Tiere (männlich und weiblich) keine signifikanten Unterschiede innerhalb ihrer Linien auf (Abb. 6a+b).

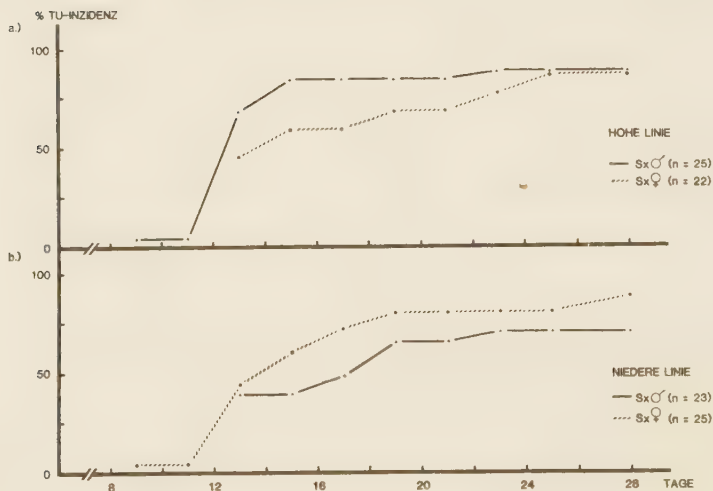


Abb. 6a+b: Tumorzinzidenz (B_{16} -Melanom) bei splenektomierten Tieren (Sx)
Vgl. männl. Tiere - weibl. Tiere

Einfluß der Milzgröße auf die Tumorzinzidenz

Die Tumorangehrate männlicher und weiblicher Tiere unterscheidet sich innerhalb der hohen und niederen Linie nicht signifikant (Abb. 5 und 6); daher sind die Geschlechter in den folgenden Abbildungen zusammengefaßt worden.

Die scheinoperierten Tiere mit hohem Milzgewicht zeigen über den gesamten Versuch eine höhere Tumorzinzidenz als die Tiere mit niederem Milzgewicht (Abb. 7a).

Die Tumorangehrate ist am 13. und 15. Versuchstag signifikant ($p < 0.05$) höher. Am 13. Tag tritt das B₁₆-Melanom schon bei über der Hälfte der Tiere (51%) auf, während nur 26% der Tiere in der niederen Linie einen Tumor tragen. Bei Versuchsende haben 92% der Tiere in der hohen und 83% der Tiere in der niederen Linie einen Tumor.

Dieses Phänomen kann man ebenfalls bei den splenektomierten Tieren beobachten. Aus Abb. 7b ist zu ersehen, daß auch hier die Mäuse mit dem ursprünglich hohen Milzgewicht über die gesamte Versuchsdauer eine höhere Tumorzinzidenz aufweisen. Am 15. Tag tragen 72% der Tiere in der hohen Linie gegenüber nur 50% der Tiere mit niederem Milzgewicht einen Tumor ($p < 0.05$). Im weiteren Verlauf des Versuchs wird der Unterschied geringer, so daß bei Versuchsende schließlich 87% der Mäuse mit hohem und 79% der Mäuse mit niederem Milzgewicht ein Melanom aufweisen.

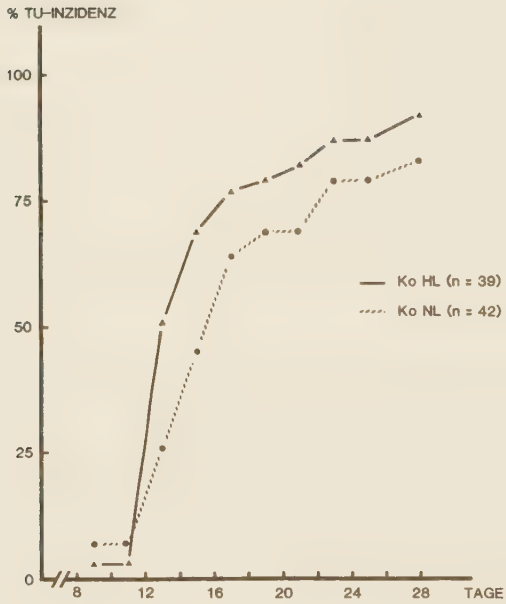


Abb. 7a: Tumorzinzidenz (B_{16} -Melanom) bei scheinoperierten Tieren (Ko)

Vgl. Hohe Linie (HL) - Niedere Linie (NL)

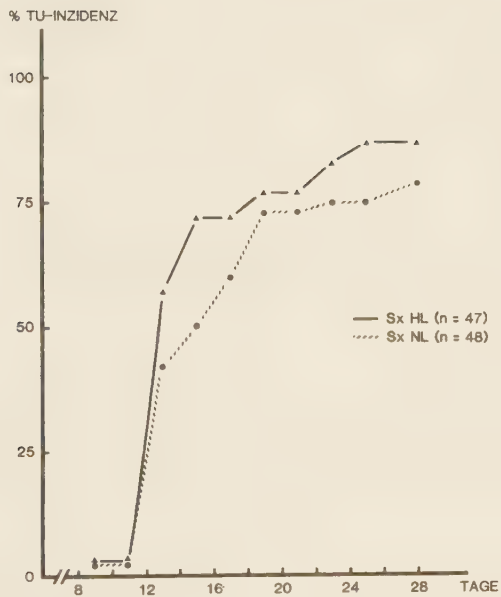


Abb. 7b: Tumorinzidenz (B_{16} -Melanom) bei splenektomierten Tieren (Sx)

Vgl. Hohe Linie (HL) - Niedere Linie (NL)

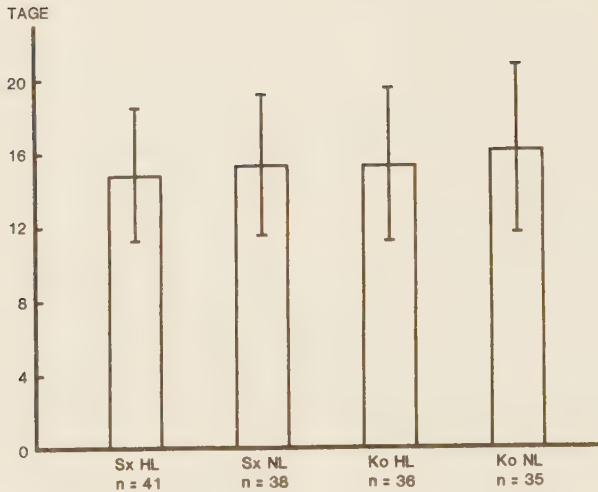


Abb. 8: Mittlerer Zeitraum (in Tagen $\pm$ s) bis zum klinischen Auftreten des B₁₆-Melanoms in splenektomierten (Sx) und scheinoperierten (Ko) Tieren der hohen (HL) und niederen (NL) Linie

In Abb. 8 ist der mittlere Zeitraum bis zum klinischen Auftreten des B₁₆-Melanoms in den einzelnen Linien gegenübergestellt worden.

Während die Inzidenz des B₁₆-Melanoms durch das höhere Milzgewicht ansteigt (Abb. 7), wird der Zeitpunkt bis zum klinischen Erscheinen des Tumors dadurch nicht beeinflusst.

Einfluß der Splenektomie auf das Tumorstadium

Die Splenektomie hat auf die Inzidenz und auf den Zeitraum bis zum Auftreten des B₁₆-Melanoms keinen Einfluß. Scheinoperierte und splenektomierte Tiere unterscheiden sich in beiden Linien nicht voneinander (Abb. 8, 9a+b).

Tumorgewicht

Tabelle 8 zeigt das mittlere Tumorgewicht der splenektomierten und scheinoperierten Tiere nach 28 Tagen. Da es sehr schwierig war, den weichen Tumor aus dem Muskelgewebe sauber freizupräparieren, ist in den späteren Versuchen auf die Bestimmung des Tumorgewichtes verzichtet worden, weil es zu ungenau zu bestimmen war; daher die geringen n-Zahlen. In der niederen Linie haben die männlichen splenektomierten Tiere ein niedrigeres Tumorgewicht als die männlichen scheinoperierten Tiere, was jedoch aufgrund der kleinen n-Zahlen nicht signifikant ist. Die weiblichen splenektomierten Mäuse der hohen Linie haben ein signifikant niedrigeres Tumorgewicht als die Kontrollen ($p < 0.05$). Die splenektomierten männlichen Mäuse der hohen Linie und die splenektomierten weiblichen Mäuse der niederen Linie zeigen hingegen im Vergleich zu den Kontrollen keinen Unterschied im Tumorgewicht.

Tabelle 8: Mittelwert der Tumorgewichte nach 28 Tagen ausgedrückt
in $g \pm s$:

	n	HL ♂	n	HL ♀	n	NL ♂	n	NL ♀
Sx	4	1.9 ± 1.98	7	0.43 ± 0.3	2	2.2 ± 1.2	4	1.7 ± 1.40
Ko	4	1.6 ± 1.10	5	2.30 ± 1.3	3	4.7 ± 2.9	3	1.6 ± 1.95

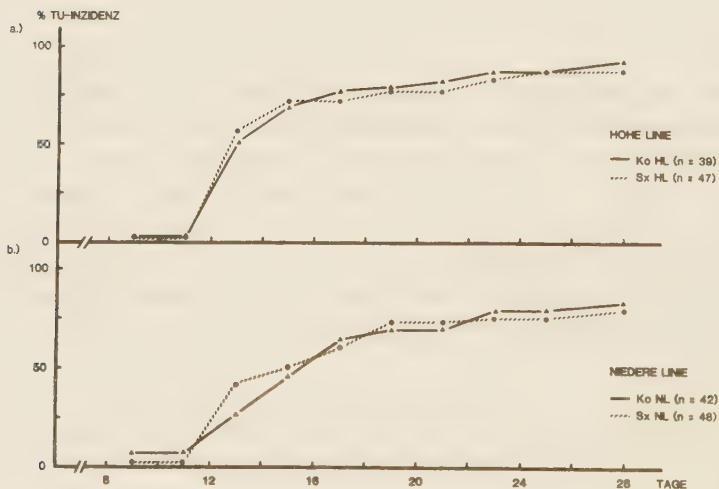


Abb. 9a+b: Tumorzinzidenz (B_{16} -Melanom)
Vgl. splenektomierte Tiere (Sx) - scheinoperierte Tiere (Ko)

b. Splenektomie + Harding-Passey-Melanom (H.P.)
Einfluß des Geschlechts auf die Tumorinzidenz

Die männlichen scheinoperierten Tiere der hohen Linie zeigen vom 17.-21. Versuchstag eine signifikant geringere Tumorangehrate als die entsprechenden weiblichen Tiere. Zu Versuchsende ist die Tumorinzidenz jedoch in beiden Geschlechtern gleich (Abb. 10a). In der niederen Linie treten über die gesamte Versuchsdauer bei männlichen und weiblichen scheinoperierten Tieren annähernd gleich häufig Tumoren auf (Abb. 10b).

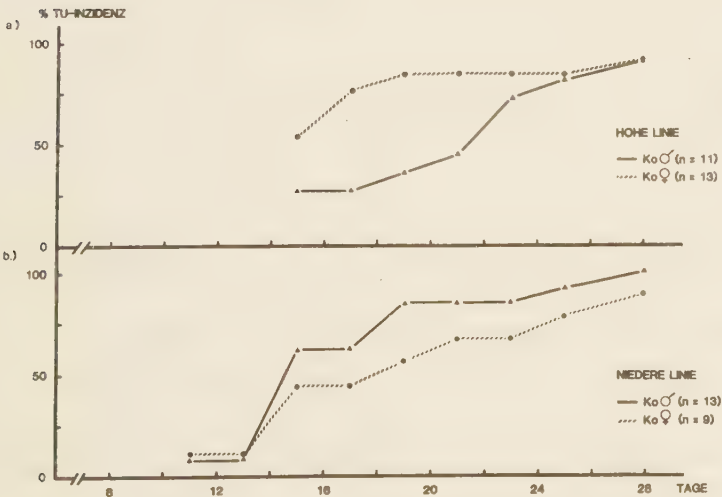


Abb. 10a+b: Tumorinzidenz (H.P.-Melanom) bei scheinoperierten Tieren (Ko)
Vgl. männliche Tiere - weibliche Tiere

Hinsichtlich ihrer Tumorangehrate weisen die splenektomierten Tiere (männlich und weiblich) keine signifikanten Unterschiede innerhalb ihrer Linien auf (Abb. 11a+b).

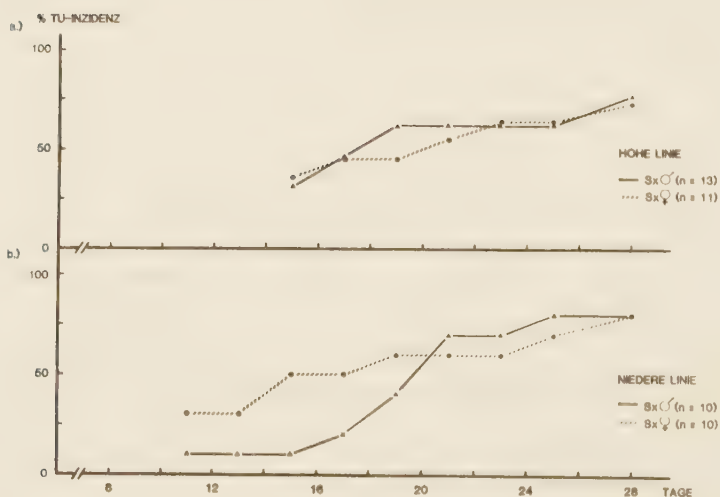


Abb. 11a+b: Tumorzinzidenz (H.P.-Melanom) bei splenektomierten Tieren (Sx)

Vgl. männliche Tiere - weibliche Tiere

Einfluß der Milzgröße auf die Tumorzinzidenz

In Abb. 12a und 12b sind männliche und weibliche Tiere zusammengefaßt, um allein den möglichen Einfluß der Milzgröße auf die Tumorangehrate zu berücksichtigen. Hierbei zeigt sich, daß die Inzidenz des Harding-Passey-Melanoms durch das unterschiedliche Ausgangsgewicht der Milz nicht beeinflusst wird. Dies ist sowohl bei scheinooperierten als auch bei splenektomierten Tieren zu beobachten.

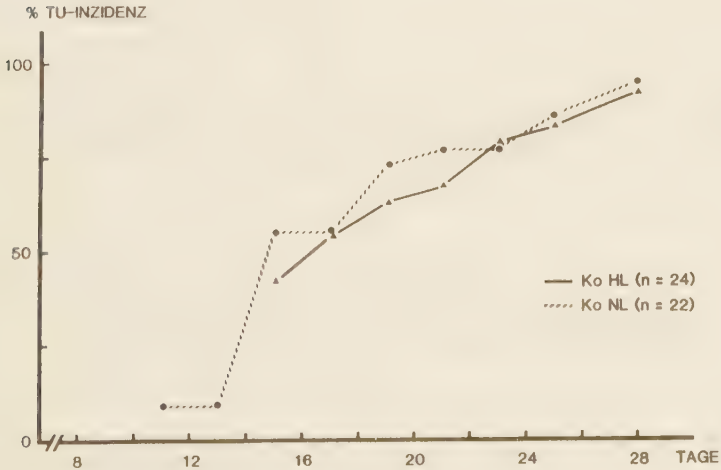


Abb. 12a: Tumorzinzidenz (H.P.-Melanom) bei scheinooperierten Tieren (Ko)
Vgl. Hohe Linie (HL) - Niedere Linie (NL)

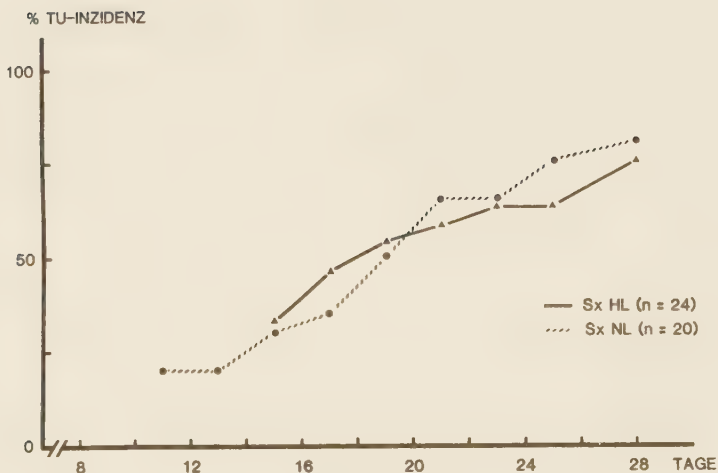


Abb. 12b: Tumorinzidenz (H.P.-Melanom) bei splenektomierten Tieren (Sx)
Vgl. Hohe Linie (HL) - Niedere Linie (NL)

Vergleicht man den Zeitpunkt bis zum klinischen Auftreten des Tumors, so unterscheiden sich auch im Falle des Harding-Passey-Melanoms beide Linien nicht voneinander (Abb. 13).

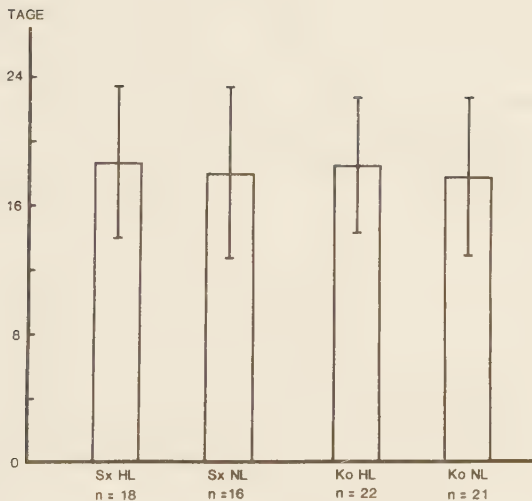


Abb. 13: Mittlerer Zeitraum (in Tagen $\pm$ s) bis zum klinischen Auftreten des H.P.-Melanoms in splenektomierten (Sx) und scheinoperierten (Ko) Tieren der hohen (HL) und niederen Linie (NL)

Einfluß der Splenektomie auf die Tumorinzidenz

Abb. 14 faßt hohe und niedere Linie sowie männliche und weibliche Tiere zusammen und berücksichtigt allein den möglichen Einfluß der Milzextirpation.



Abb. 14: Tumorzinzidenz (H.P.-Melanom)

Vgl. splenektomierte Tiere (Sx) - scheinoperierte Tiere (Ko)

Am 15. Versuchstag tragen 32% der splenektomierten gegenüber 48% der scheinoperierten Tiere einen Tumor. Splenektomie reduziert die Angehrate des Harding-Passey-Melanoms über die gesamte Versuchsdauer um rund 15%, so daß nach vier Wochen nur bei 77% der splenektomierten Mäuse gegenüber 93% der Kontrolltiere ein Melanom auftritt; dieser Unterschied hinsichtlich der Tumorzinzidenz ist signifikant ($p < 0.05$). Der Zeitraum bis zum klinischen Auftreten des Tumors wird jedoch durch die Splenektomie nicht beeinflusst (Abb. 13).

1.3. Transfer von Milz-Lymphozyten

Durch Übertragung von Lymphozyten sollte untersucht werden, welchen Einfluß sensibilisierte Lymphozyten auf das Wachstum von Tumoren haben. Abb. 15a zeigt, daß Lymphozyten, die vier Tage Tumorantigen-spezifisch sensibilisiert wurden, die Tumorzinzidenz in der hohen Linie signifikant erhöhen ($p < 0.01$). Elf Tage nach Versuchsbeginn palpiert man schon bei 65% der sensibilisierten Gruppe einen Tumor; zum selben Zeitpunkt tritt der Tumor erst bei 8% der Kontrollgruppe auf. Nach 14 Tagen tragen in der hohen Linie schließlich 88% der Mäuse, die sensibilisierte Lymphozyten injiziert bekamen, einen Tumor gegenüber nur 33% der Kontrolltiere. In der niederen Linie ist diese Beobachtung noch eindrucksvoller (Abb. 15b). Hier tritt der Tumor in der Kontrollgruppe nach 17 Tagen bei 8% der Tiere auf; zu diesem Zeitpunkt weisen aber schon 73% der sensibilisierten Tiere Melanome auf. Nach 28 Tagen palpiert man bei 87% der Tiere, die sensibilisierte Lymphozyten erhielten, gegenüber nur 25% der Kontrolltiere einen Tumor.

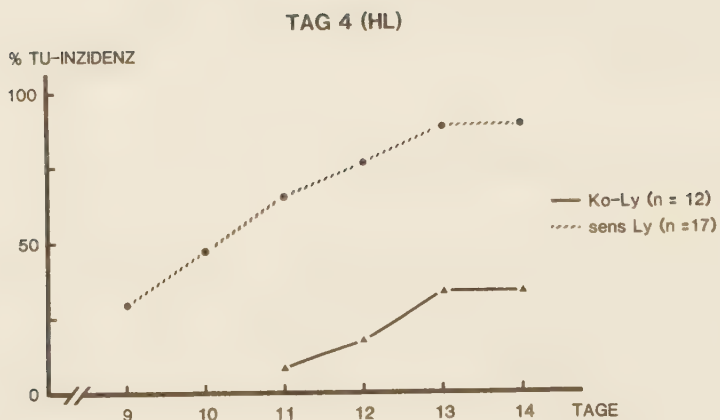


Abb. 15a: Tumorzinzidenz nach Transfer von Milz-Lymphozyten, die vier Tage sensibilisiert wurden (Hohe Linie)
Vgl. sensibilisierte Lymphozyten (sens.Ly) - Kontroll-Lymphozyten (Ko-Ly)

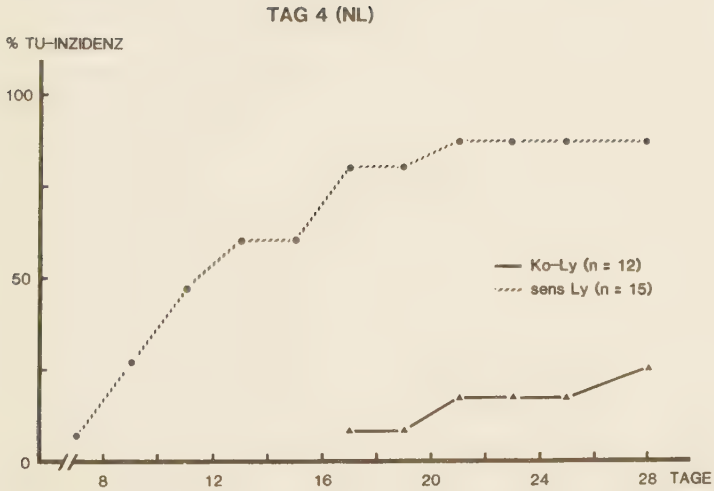


Abb. 15b: Tumorinzidenz nach Transfer von Milz-Lymphozyten, die vier Tage sensibilisiert wurden (Niedere Linie)
Vgl. sensibilisierte Lymphozyten (sens.Ly) - Kontroll-Lymphozyten (Ko-Ly)

Die erhöhte Tumorzinzidenz der Tiere, die sensibilisierte Lymphozyten erhalten haben, korreliert mit einem früheren Auftreten der Melanome (Abb.16). Die Tumoren erscheinen bei den sensibilisierten Tieren in der hohen Linie im Schnitt schon nach 10.5 Tagen, bei den Kontrollen nach 12.3 Tagen ($p < 0.05$); in der niederen Linie wird bei den sensibilisierten Tieren nach 12.7 Tagen, bei den Kontrolltieren erst nach 22 Tagen ein Auftreten des Melanoms beobachtet ($p < 0.01$).

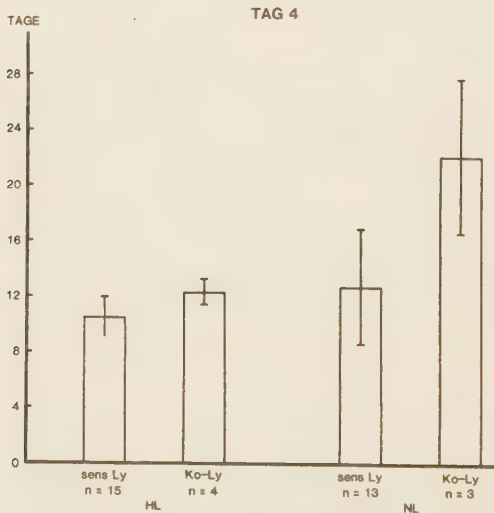


Abb. 16: Mittlerer Zeitraum (in Tagen $\pm$ s) bis zum klinischen Auftreten des B₁₆-Melanoms in Mäusen der hohen (HL) und niederen (NL) Linie nach Transfer von sensibilisierten Lymphozyten (sens.Ly) bzw. Kontroll-Lymphozyten (Ko-Ly)

Werden die Lymphozyten zehn Tage lang Tumorantigen-spezifisch sensibilisiert, ist die Tumorzinzidenz bei den sensibilisierten Tieren in beiden Linien zu Beginn zwar höher, doch im weiteren Verlauf des Versuchs stagniert diese und zeigt keine Unterschiede mehr (Abb. 17a und 17b).

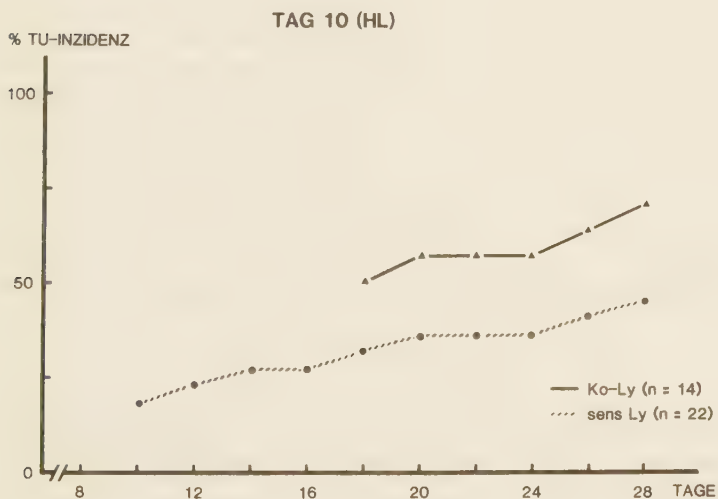


Abb. 17a: Tumorzinzidenz nach Transfer von Milz-Lymphozyten, die zehn Tage sensibilisiert wurden (Hohe Linie)
Vgl. sensibilisierte Lymphozyten (sens.Ly) - Kontroll-Lymphozyten (Ko-Ly)

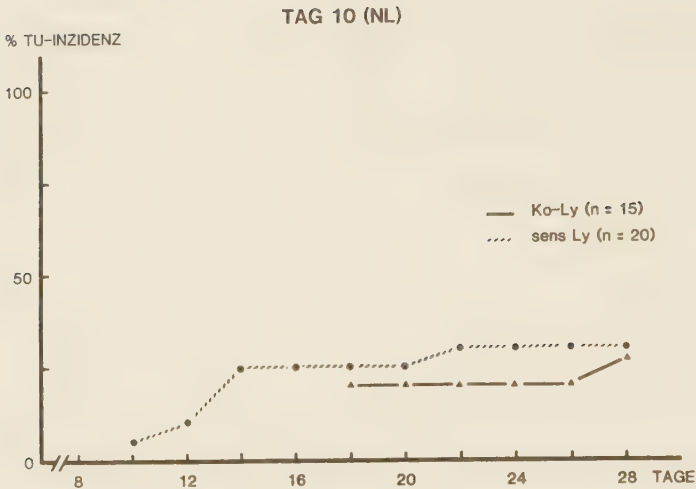


Abb. 17b: Tumorzinzidenz nach Transfer von Milz-Lymphozyten, die zehn Tage sensibilisiert wurden (Niedere Linie)
Vgl. sensibilisierte Lymphozyten (sens.Ly) - Kontroll-Lymphozyten (Ko-Ly)

Die zu Beginn erhöhte Tumorzinzidenz korreliert mit einem früheren Auftreten der Tumoren bei den Tieren, denen sensibilisierte Lymphozyten injiziert wurden. Das B₁₆-Melanom erscheint in der hohen Linie bei den sensibilisierten Tieren schon nach 16.5 Tagen, bei den Kontrollen nach 20.7 Tagen; sensibilisierte Tiere der niederen Linie weisen nach 15.3 Tagen, die dazugehörigen Kontrollen nach 21.3 Tagen einen Tumor auf (Abb. 18).

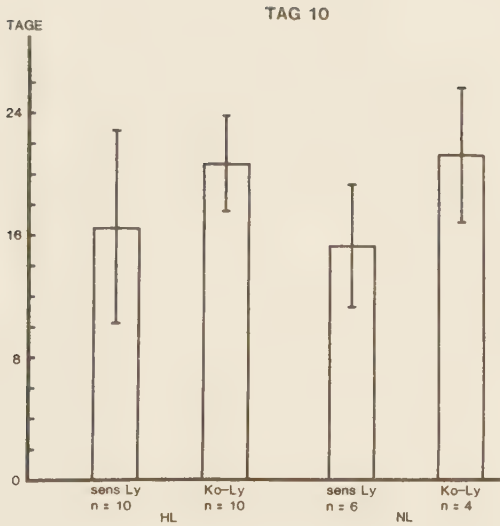


Abb. 18: Mittlerer Zeitraum (in Tagen $\pm$ s) bis zum klinischen Auftreten des B₁₆-Melanoms bei Mäusen der hohen (HL) und niederen (NL) Linie nach Transfer von sensibilisierten Lymphozyten (sens.Ly) vom Tag 10 bzw. Kontroll-Lymphozyten (Ko-Ly)

1.4. Transfer von Thymus-Lymphozyten

In einem weiteren Versuch sollte geprüft werden, ob der tumorprotektive Effekt ebenso von T-Lymphozyten hervorgerufen werden kann. Zu diesem Zweck wurden diesmal Lymphozyten aus dem Thymus (98% T-Lymphozyten) übertragen. Abb. 19a zeigt, daß diese Thymus-Lymphozyten, die fünf Tage Tumorantigen-spezifisch sensibilisiert worden waren, die Tumorzinzidenz erhöhen. Von Anfang an treten in der hohen Linie die Tumoren bei den sensibilisierten Tieren häufiger auf. Ab dem 23. Versuchstag ist die Angehrate signifikant höher ($p < 0.05$), so daß bei Versuchsende 86% der Mäuse, denen sensibilisierte Thymozyten übertragen wurden, gegenüber nur 38% der Kontrolltiere einen Tumor tragen.

Zu keinem Zeitpunkt des Versuchs sieht man hingegen einen Unterschied hinsichtlich der Tumorangehrate zwischen den Tieren, die gleichzeitig mit Tumorgabe Thymozyten von unbehandelten Mäusen erhalten haben, und Kontrolltieren, denen nur Tumorzellen injiziert wurden.

Da sich in der niederen Linie männliche und weibliche Tiere hinsichtlich der Tumorangehrate nicht signifikant voneinander unterscheiden, sind sie in Abb. 19b zusammengefaßt worden. Man sieht, daß auch in der niederen Linie die sensibilisierten Tiere eine höhere Tumorzinzidenz aufweisen. Am 17. Versuchstag tritt das Melanom bei 45% der Mäuse auf, während man zu diesem Zeitpunkt nur bei 11% der Kontrolltiere einen Tumor palpieren kann ($p < 0.05$). Am 28. Tag beobachtet man bei 60% der Mäuse, die sensibilisierte Thymozyten erhalten haben, und nur bei 22% der Kontrolltiere ($p < 0.05$) ein Melanom.

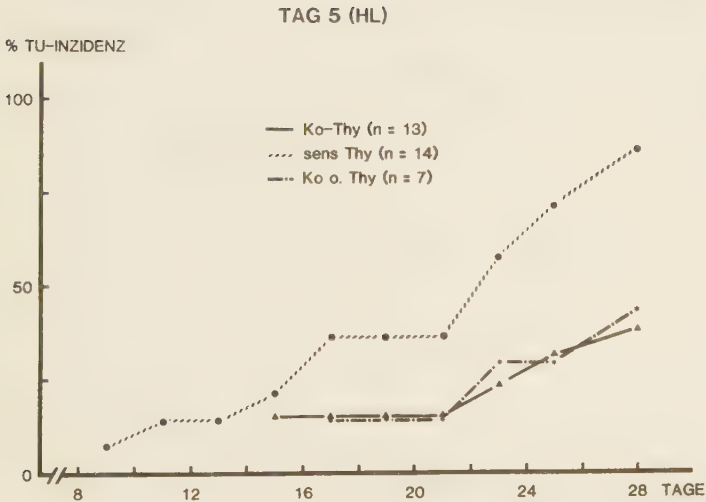


Abb. 19a: Tumorzinzidenz nach Transfer von Thymus-Lymphozyten, die fünf Tage sensibilisiert wurden (Hohe Linie)
Vgl. sensibilisierte Thymozyten (sens.Thy) - Kontroll-Thymozyten (Ko-Thy) - Kontrollen ohne Thymozyten (Ko o. Thy)

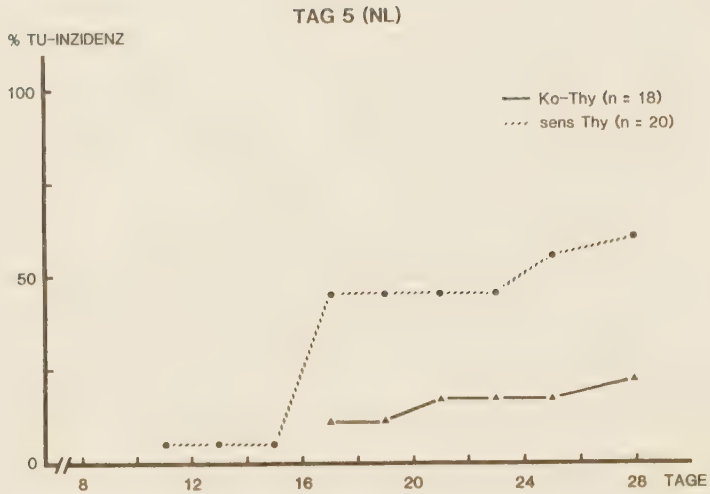


Abb. 19b: Tumorinzidenz nach Transfer von Thymus-Lymphozyten, die fünf Tage sensibilisiert wurden (Niedere Linie)
Vgl. sensibilisierte Thymozyten (sens.Thy) - Kontroll-Thymozyten (Ko-Thy)

Hingegen korreliert in diesem Fall die erhöhte Tumorzinzidenz bei den sensibilisierten Tieren nicht mit einem früheren Auftreten der Melanome. Weder in der hohen noch in der niederen Linie unterscheidet sich der Zeitraum bis zum klinischen Erscheinen der Tumoren zwischen Mäusen, die sensibilisierte bzw. Kontroll-Thymozyten erhalten haben (Abb. 20).

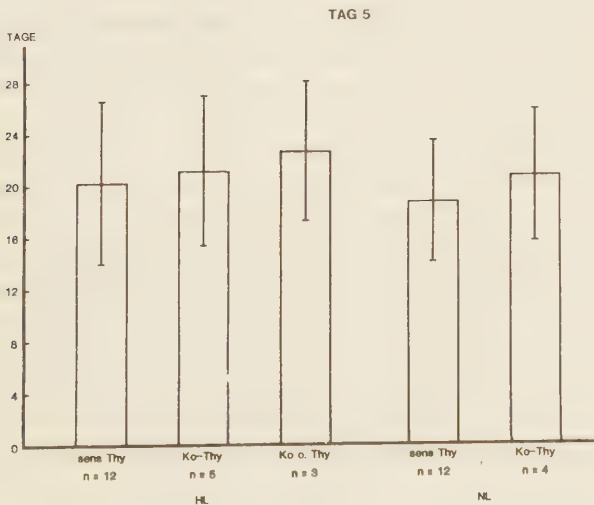


Abb. 20: Mittlerer Zeitraum (in Tagen $\pm$ s) bis zum klinischen Auftreten des B¹⁶-Melanoms in Mäusen der hohen (HL) und niederen Linie (NL) nach Transfer von sensibilisierten Thymozyten (sens.Thy) vom Tag 5, bzw. Kontroll-Thymozyten (Ko-Thy) und Kontrollen ohne Thymozyten (Ko o. Thy)

1.5 Untersuchung der Milz

a. Milzgewicht

Das Milzgewicht der hohen und niederen Linie unterscheidet sich in beiden Geschlechtern hochsignifikant ($p < 0.0001$). Dies ist sowohl vor als auch nach Tumorgabe zu beobachten (Tab. 9). Das Milzgewicht nimmt im Verlauf des Tumorstadiums in allen Gruppen ebenso signifikant zu ($p < 0.0001$), wobei die Zunahme in der niederen Linie ausgeprägter ist.

Tabelle 9: Mittelwert der Milzgewichte ausgedrückt in $g \pm s$ vor bzw. 28 Tage nach Tumordinokulation, sowie Zunahme des Milzgewichts nach Tumorgabe in % in hoher (HL) und niederer Linie (NL):

	n	HL ♂	n	HL ♀	n	NL ♂	n	NL ♀
Milzgewicht vor Tu-Gabe	45	0.18 ± 0.05	69	0.18 ± 0.04	36	0.13 ± 0.04	46	0.11 ± 0.04
28 Tg. nach Tu-Gabe	25	0.24 ± 0.06	19	0.26 ± 0.07	20	0.20 ± 0.05	20	0.16 ± 0.05
Zunahme		33%		40%		54%		45%

b. Histologie der Milz

Alle Milzen zeigen in der roten Pulpa, bevorzugt subkapsulär, zahlreiche Megakaryocyten. Dazwischen sind reichlich runde Lymphfollikel mit meist zentralständigen Arteriolen erkennbar, gelegentlich sind auch Keimzentren vorhanden, die aber meist klein sind und nicht mehr als ein Viertel der Fläche einnehmen (Abb. 21). In der roten Pulpa finden sich Ablagerungen von Eisen, gelegentlich sind wenige Granulozyten zu erkennen. Lediglich die Milzfollikel männlicher Tiere aus der niederen Linie scheinen im Durchschnitt einen geringgradig größeren Durchmesser aufzuweisen.

Im histologischen Präparat lassen die Kontrollmilzen zwischen den Linien und zwischen den Geschlechtern keine Unterschiede erkennen. Nach 28 Tagen Tumorstadium zeigen die Milzen der männlichen und weiblichen Mäuse aus der hohen Linie gegenüber den Kontrollmilzen mäßig vergrößerte Lymphfollikel, die Keimzentren aufweisen. Hier beobachtet man eine deutliche Kerntrümmerphagozytose und gelegentlich sind auch Mitosen erkennbar (Abb. 22). Auffällig ist gegenüber den Kontrollmilzen, daß teilweise die rote Pulpa ebenfalls dicht mit haufenförmig angeordneten Lymphozyten ausgefüllt ist. Daneben sieht man hier gegenüber den Kontrollmilzen deutlich mehr Granulozyten und gelegentlich auch etwas unreifere myeloische Zellen, die in der Chlorazetatesterase-Reaktion positiv sind. Auch hier liegen deutliche Ablagerungen von Eisenpigment vor.

Die Milzen der niederen Linie zeigen ähnliche Befunde, nur daß hier die Veränderungen eindrucksmäßig im Durchschnitt etwas geringer sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Milzen nach Tumorbelastrung Veränderungen im Sinne einer erheblichen unspezifischen entzündlichen Reaktion zeigen. Möglicherweise ist dies Ausdruck einer gesteigerten Zellproliferation als Reaktion auf die Tumorbelastrung.



Abb. 21: Milzfollikel einer Maus ohne Melanom
Vergrößerung 150x



Abb. 22: Milzfollikel einer Maus mit B₁₆-Melanom
Vergrößerung 150x; Ausschnitt 350x

1.6. Tumorzinzidenz bei genetisch bedingt milzlosen Mäusen

a. B₁₆-Melanom

16

Die Kontrolltiere mit Milz zeigen von Beginn an eine höhere Tumorangehrate als die milzlosen Mäuse (Abb. 23). Es fällt auf, daß bei weiblichen milzlosen Mäusen erst spät ein Tumor auftritt, dann aber die Tumorzinzidenz relativ stark ansteigt, so daß zu Versuchsende bei 44% der milzlosen Mäuse gegenüber 60% der Kontrolltiere ein Melanom zu palpieren ist. Die männlichen milzlosen Mäuse hingegen werden über den gesamten Beobachtungszeitraum nur zu 14% von einem Melanom befallen.

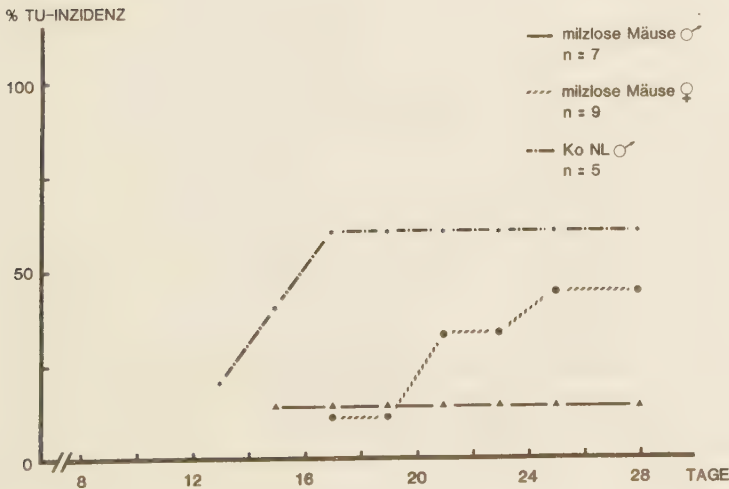


Abb. 23: Tumorzinzidenz (B₁₆-Melanom)

Vgl. Milzlose Mäuse - Kontrolltiere mit Milz (Ko-NL♂)

Bei den milzlosen weiblichen Mäusen tritt der Tumor nach durchschnittlich 21.0 Tagen, bei den Kontrolltieren mit Milz schon nach 15.0 Tagen auf ($p < 0.05$) (Abb. 24).

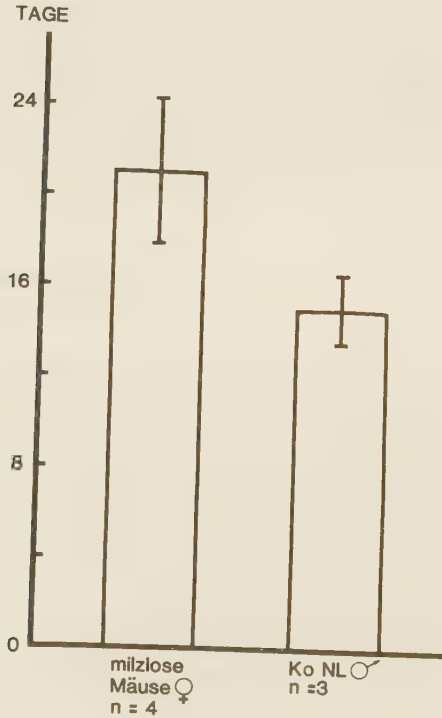


Abb. 24: Mittlerer Zeitraum (in Tagen $\pm$ s) bis zum klinischen Auftreten des B₁₆-Melanoms bei milzlosen Mäusen und Kontrolltieren

b. Harding-Passey-Melanom

Im Falle des H.P.-Melanoms lassen sich keine Unterschiede zwischen milzlosen Mäusen und Tieren mit Milz erkennen (Abb. 25). Die Tumorzinzidenz der milzlosen Mäuse liegt während des gesamten Versuchs zwischen beiden Kontrollgruppen.

Auch der Zeitraum bis zum Auftreten der Tumoren ist in allen Gruppen annähernd gleich (Abb. 26).

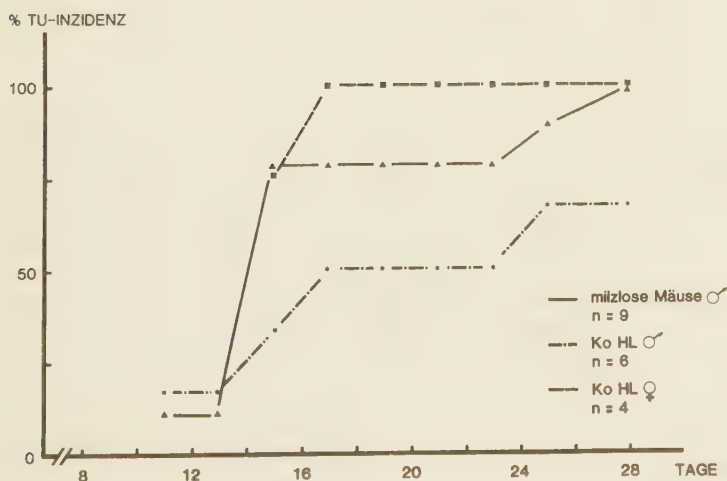


Abb. 25: Tumorzinzidenz (H.P.-Melanom)

Vgl. Milzlose Mäuse - Kontrolltiere mit Milz
(Ko HL♂; Ko HL♀)



Abb. 26: Mittlerer Zeitraum (in Tagen $\pm$ s) bis zum klinischen Auftreten des H.P.-Melanoms bei milzlosen Mäusen und Kontrolltieren

Am 14. bzw. 28 Tag nach Tumordinoculation wurden die Leukozyten im peripheren Blut bestimmt. Als Vergleichsgruppe dienten Tiere mit Milz, die NaCl statt Melanomzellen injiziert bekommen hatten (Tab.10). Die milzlosen Mäuse haben im Verlauf ihres Tumorstadiums konstante Leukozytenzahlen, jedoch im Vergleich zu den Kontrollen eine sehr ausgeprägte Leukozytose ($p < 0.01$). Die Kontrolltiere mit Tumor haben 28 Tage nach Tumorgabe im Vergleich zu den Kochsalzkontrollen eine signifikante Leukozytose ($p < 0.001$). Die Tiere, die nur NaCl erhalten haben, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Tabelle 10: Leukozyten im peripheren Blut/mm³ ($\bar{x} \pm s$)
14 bzw. 28 Tage nach Tumorgabe

Leuko- zyten	n	milzlose Mäuse mit Tumor	n	Kontrolltiere mit Tumor	n	Kontrolltiere (NaCl)
nach 14 Tg.	3	17867 $\pm$ 3677	3	3467 $\pm$ 321	3	6033 $\pm$ 1358
nach 28 Tg.	9	15311 $\pm$ 3304	10	6295 $\pm$ 389	6	5317 $\pm$ 518

2. In vitro-Versuche

2.1. Direkte Immunfluoreszenz

a. Splenektomie + H.P.-Melanom

Tabelle 11 zeigt den prozentualen Anteil der B-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten. Letztere sind in tumordrainierende und nicht-drainierende Lymphknoten unterteilt.

Mit Ausnahme der weiblichen Tiere in der hohen Linie haben die splenektomierten Mäuse einen geringeren Anteil an B-Lymphozyten in tumordrainierenden als in nicht-drainierenden Lymphknoten; bei den scheinoperierten Tieren verhält sich der Anteil der B-Lymphozyten dagegen umgekehrt.

Hohe und niedere Linie zeigen hinsichtlich ihres B-Zellanteils in der Milz keinen Unterschied.

Tabelle 11: Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten in Milz, drain. und nicht-drain. Lymphknoten (LK)

	drain.LK	nicht-drain.LK	Milz
HL	Sx♂ (n=6)	24	36
	Ko♂ (n=6)	28	24
	Sx♀ (n=5)	26	18
	Ko♀ (n=5)	42	32
NL	Sx♂ (n=6)	24	34
	Ko♂ (n=7)	26	24
	Sx♀ (n=4)	25	36

b. Splenektomie + B₁₆-Melanom

Splenektomierte und scheinoperierte Tiere zeigen in beiden Linien keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer B-Zellverteilung in den Lymphknoten (Tab. 12a). Auch in der Milz lassen sich zwischen hoher und niederer Linie keine Unterschiede feststellen.

Tabelle 12a: Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten in Lymphknoten (LK) und Milz ($\bar{x} \pm s$)

	LK	Milz
HL	Sx♂ (n=5) 25.0 $\pm$ 13.2	---
	Ko♂ (n=4) 27.0 $\pm$ 7.4	29.8 $\pm$ 6.3
HL	Sx♀ (n=5) 19.0 $\pm$ 13.0	---
	Ko♀ (n=5) 23.6 $\pm$ 7.7	32.2 $\pm$ 8.3
NL	Sx♂ (n=6) 18.8 $\pm$ 8.7	---
	Ko♂ (n=4) 23.3 $\pm$ 9.3	39.6 $\pm$ 12.0
NL	Sx♀ (n=5) 17.6 $\pm$ 4.4	---
	Ko♀ (n=5) 19.8 $\pm$ 7.0	34.4 $\pm$ 10.7

Um eine differenziertere Aussage über den Einfluß des Tumorzellwachstums auf die Verteilung der B-Lymphozyten machen zu können, wurde zwischen melanomtragenden Mäusen und solchen, bei denen trotz Tumorzellinoculation nach 28 Tagen kein Melanom palpirt werden konnte, unterschieden.

Dazu wurden splenektomierte und scheinoperierte Tiere beider Linien zusammengefaßt (Tab. 12b). Zusätzlich wurde zum Vergleich die B-Zellverteilung in der Milz von Tieren, die nur NaCl injiziert bekommen hatten, untersucht. Tumortragende Tiere haben signifikant mehr B-Lymphozyten in ihren Lymphknoten als Tiere ohne Melanom ($p < 0.05$). Auch die Milz tumorbefallener Mäuse zeigt einen höheren B-Zellanteil - ca. 30% mehr als vergleichbare Tiere ohne Melanom. Hingegen unterscheiden sich Mäuse, die NaCl erhielten, und Tiere ohne Melanom kaum voneinander.

Tabelle 12b: Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten in Lymphknoten (LK) und Milz bei Tieren mit und ohne Melanom 28 Tage nach Tumorgabe und Kontrollen (Ko) nach NaCl-Gabe ($\bar{x} \pm s$)

	n	LK	n	Milz
Tiere mit Tumor	26	23.7 ± 9.2	13	36.9 ± 8.5
Tiere ohne Tumor	12	17.0 ± 6.9	6	28.3 ± 10.0
Ko + NaCl	--	---	4	23.0 ± 8.0

c. Milzlose Mäuse (B₁₆-Melanom)

Die Lymphknoten von Mäusen mit und ohne Milz unterscheiden sich hinsichtlich ihres B-Zellanteils nicht voneinander; alle Tiere mit B₁₆-Melanom haben etwa den gleichen Anteil an B-Lymphozyten. Dabei fällt jedoch auf, daß die Kontrolltiere, die nur Kochsalz erhielten, in Lymphknoten und Milz geringere Anteile an B-Zellen haben als Mäuse, denen Melanomzellen übertragen wurden (Tab. 13).

Tabelle 13: Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten in Lymphknoten (LK) und Milz bei Mäusen mit und ohne Milz, die NaCl bzw. B₁₆-Melanomzellen erhielten ($\bar{x} \pm s$)

			LK	Milz
B ₁₆ -Melanom:	milzlos ♂ (n=7)		12.0 $\pm$ 7.0	---
	milzlos ♀ (n=9)		12.6 $\pm$ 8.0	---
	Ko NL ♂ (n=5)		16.4 $\pm$ 6.5	36.2 $\pm$ 19.8
NaCl:	milzlos ♂ (n=1)		10.0 $\pm$ 0.0	---
	milzlos ♀ (n=2)		11.0 $\pm$ 1.4	---
	Ko NL ♂ (n=2)		3.7 $\pm$ 3.5	16.0 $\pm$ 2.0

D. DISKUSSION

Funktion des Immunsystems

Lymphatisches Gewebe findet man in den Lymphknoten, der Milz, dem Thymus und im Gastrointestinaltrakt (Peyer'sche Plaques, Appendix, Tonsillen). Das gesamte Lymphsystem hat drei prinzipielle Funktionen (133):

1. Konzentrierung von Antigenen aus allen Körperteilen in einige wenige lymphatische Organe.
2. Zirkulation von Lymphozyten durch diese Organe, so daß jedes Antigen (Ag) in kurzer Zeit mit Ag-spezifischen Lymphozyten in Kontakt kommt.
3. Transport von Produkten der Immunantwort (z.B. humorale Antikörper) ins Blut und Gewebe.

Das Immunsystem wird unterteilt in die zellvermittelte und humorale Immunantwort. Erstere wird durch T-Lymphozyten, letztere durch B-Lymphozyten vermittelt. T- und B-Zellen gehen entwicklungsgeschichtlich aus einer gemeinsamen Stammzelle im Dottersack (26) hervor.

Ein Teil der Zellen wandert von dort in den Thymus ein und differenziert hier zu T-Lymphozyten. Aus dem Thymus treten diese T-Zellen in die Blutzirkulation über und gelangen in die Thymus-abhängigen Bezirke der übrigen lymphatischen Organe, d.h. in die parakortikalen Bereiche der Lymphknoten und die periarteriolären Zonen der Milz. Der Thymus der Maus enthält ca. 98-100% T-Lymphozyten, die Lymphknoten 65-70%, Blut ebenfalls 70% und die Milz 30-35%. Diese Werte schwanken jedoch bei den verschiedenen Autoren (80, 112, 134). Die T-Lymphozyten kann man wiederum in verschiedene Subpopulationen unterteilen, die Tab. 14 zeigt (133).

Tabelle 14: T-Zell-Subpopulationen und ihre Funktionen

T-Helper (H) oder: Diese Zellen erkennen ein Antigen und
T-Amplifier (A) unterstützen (T_H) bzw. verstärken (T_A)
die Antwort der Antigen-spezifischen T_C -
und B-Lymphozyten.

T-cytotoxic (C) : Diese cytotoxischen Zellen erkennen
das Antigen auf veränderten oder
transplantierten Zellen und lysieren
diese sogenannten "Targetzellen".

T_D : Diese Zellen können DTH (delayed
type hypersensitivity) übertragen; sie
sind unfähig, Targetzellen zu lysieren.

T-Suppressor (S): Diese Zellen supprimieren die humorale
und zelluläre Immunantwort als Oponen-
ten der T-Helper-Lymphozyten.

Die zweite Zell-Linie hingegen differenziert bei den Vögeln in
der Bursa Fabricii, bei den Säugern (Menschen, Mäusen etc.) im
sogenannten Bursa-Äquivalent zu B-Lymphozyten. Fichtelius (39)
nahm an, daß bei den Säugern der Gastrointestinaltrakt u.a. die
Funktion der Bursa Fabricii einnimmt. Diese Theorie ist jedoch
heute nicht mehr anerkannt, und man nimmt stattdessen an (26),
daß beim Menschen und der Maus die B-Lymphozyten in der fetalen
Leber und der Milz differenzieren, um dann ins Knochenmark zu
wandern. Von dort gelangen die B-Zellen in ihre spezifischen Be-
reiche, d.h. in die Primärfollikel der Lymphknoten (55) bzw. in
die Milzfollikel. Werden Gewebsschnitte mit fluoreszierenden An-
ti-Immunglobulin-Seren untersucht, so findet man bei der Maus in
den Lymphknoten ca. 20-30%, in der Milz 30-55%, im Blut 10-15%

und im Thymus 1-2% B-Lymphozyten. Auch diese Werte schwanken erheblich bei den verschiedenen Autoren (2,55,80,134).

Nach Antigenstimulation proliferieren die B-Zellen mit Unterstützung der T-Lymphozyten und bilden B-Memory- und Plasmazellen, wobei letztere wiederum Immunglobuline produzieren. T- und B-Lymphozyten sind ausgereifte Zellen, wodurch ihre Zugehörigkeit zu der jeweiligen Zell-Linie festgelegt ist.

Für eine optimale Antikörper-Produktion gegen die meisten Antigene sind mindestens drei verschiedene Zelltypen notwendig: T-, B-Lymphozyten und Macrophagen. T-Zellen und Lymphozyten aus dem Knochenmark (B-Zellen) wirken synergistisch, wenn sie in einer bestrahlten Maus auf ihre Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, untersucht werden (23), oder wenn sie in vitro stimuliert werden (33). Da Milzzellen allein in vitro eine optimale Immunantwort geben, kann man schließen, daß die Milz sowohl diese beiden Zelltypen als auch Macrophagen enthält.

Wird ein Organismus lokal immunisiert, so werden Antikörper-produzierende Zellen zuerst in den regionalen Lymphknoten und im Peritonealexsudat, später auch im Knochenmark, Blut und in der Milz gefunden (59). Außerdem wandern Lymphozyten aus dem Knochenmark in die peripheren Lymphknoten ein, die das Gebiet, in das das Antigen injiziert wurde, drainieren (84).

In den Lymphknoten müssen B-Lymphozyten parakortikale Bereiche (T-Zell-spezifisch) passieren, um in die B-Zell-spezifischen Keimzentren bzw. Sekundärfollikel zu gelangen (55, 133). Dadurch können schon hier T- und B-Zellen Informationen über die Immunantwort mittels Chemotaxis bzw. direktem Zellkontakt austauschen.

Werden Mäuse dagegen nicht lokal, sondern intraperitoneal (i.p.) mit Schafererythrozyten immunisiert, dann findet man zuerst in der Milz die höchsten Antikörpertiter - und zwar vier Tage nach Immunisierung (21). Dies wurde in Versuchen mit Hamstern bestätigt (2). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden (39), daß Lymphozyten aus dem Thymus, aus der Bursa Fabricii bzw. Darm, aus

den Lymphknoten und dem Knochenmark in die Milz wandern. Linna (85) vermutet daher, daß die weiße Pulpa der Milz der Ort ist, wo Lymphozyten aus Thymus und Knochenmark in Wechselwirkung miteinander treten, um Informationen auszutauschen. Somit hätte der Organismus einen anatomisch eng begrenzten Raum, wo Macrophagen, T- und B-Lymphozyten miteinander reagieren können. In der Milz müssen analog wie im Lymphknoten B-Lymphozyten T-Zell-spezifische Bereiche durchwandern, um in die Follikel zu gelangen (55).

Insgesamt gesehen sind die Lymphozyten in Lymphknoten und Milz wandernde Zellen, die nach einigen Stunden in anderen Körperteilen zu finden sind. Der größte Anteil der Lymphozyten zirkuliert vom lymphatischen Gewebe über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf, gelangt von dort in die Milz und tauscht hier Informationen aus. Von dort treten die Lymphozyten dann erneut ins Blut über und gelangen wieder in die Bereiche, die dem jeweiligen Antigenstimulus ausgesetzt worden waren (53). Dieses Phänomen der Lymphozytenzirkulation wird "homing" genannt.

Funktion der Milz:

Die Milz ist ein Organ, das sich die gesamte Evolution über in jedem Säuger entwickelt hat, und trotzdem ist sie nach ihren bisher bekannten Funktionen nicht lebensnotwendig. Die Milz entwickelte sich phylogenetisch in zwei Hauptrichtungen - in die Gefäß- oder Speichermilz und in die Stoffwechsellmilz (65). Erste hat einen hohen Anteil an glatter Muskulatur und roter Pulpa und dient hauptsächlich der Blutspeicherung; sie kommt vor allem bei Pferden, Hunden und Katzen vor. Die Stoffwechsellmilz, auch Abwehrmilz bzw. Milz vom Immunisierungstyp genannt, ist kleiner als die Speichermilz, hat einen hohen Anteil an lymphatischem Gewebe bzw. weißer Pulpa und dient vor allem der Immunabwehr; ihr Vorkommen wird hauptsächlich bei Menschen und Nagern (Kaninchen,

Maus, Hamster) beobachtet.

Während der Embryonalzeit ist die Milz zusammen mit der Leber der Hauptort der Hämoopoese mit anfänglicher Myelopoese und späterer Lymphopoese (hepatolienale Phase). Post partum dient die Milz im Rahmen der Blutzirkulation als Speicher von Eisen und Blut, weiterhin als Filterorgan von Fremdpartikeln bzw. geschädigten Erythrozyten, die phagozytiert werden. Im Rahmen der Immunabwehr ist sie der Ort der Interaktion von T-, B-Lymphozyten und Macrophagen. Pathologisch vergrößerte Milzen führen zum Hypersplenie-Syndrom mit Anämie, Leuko- und Thrombopenie. Dies ist nicht die Folge der splenogenen Markhemmung, wie früher postuliert wurde (65), sondern auf eine übermäßige Phagozytose der Blutpartikel durch die vergrößerte Milz zurückzuführen (29).

Tumorimmunologie

Die Tumorimmunologie spielt in der Tumorforschung seit einigen Jahren eine zunehmende Rolle. Prehn zeigte 1957, daß man tumorspezifische Immunität dadurch erzeugen kann, daß man einen Tumor wachsen läßt und ihn dann operativ entfernt. Ein erneutes Wachstum desselben Malignoms nach wiederholter Tumorgabe wurde daraufhin von diesen Tieren supprimiert (111). Deshalb nahm man an, daß die Immunüberwachung bei der Tumorgenese eine bedeutende Rolle spielt. Sollte dies der Fall sein, müßten eine Reihe von Bedingungen erfüllt sein (110):

1. Der Tumor muß antigen sein und das Tumor-Antigen muß früh während des Tumorstwachstums auftreten.
2. Das Tumor-Antigen muß in der Lage sein, im Wirt eine Immunreaktion auszulösen (d.h. es muß immunogen sein).
3. Der Wirt muß immunologisch kompetent sein, auf das Tumor-Antigen zu reagieren.
4. Die Immunreaktion des Wirtes darf nicht zur Toleranz oder Immunverstärkung (Enhancement) führen.

5. Die Expression des Antigens muß konstant sein und jede Tumorzelle muß ein erkennbares Antigen tragen.
6. Die Immunreaktion auf das Tumor-Antigen muß die Lebensfähigkeit der Tumorzelle beeinträchtigen (zytotoxisch) oder das Wachstum der Tumorzellen hemmen (zytostatisch).

Man hat tatsächlich festgestellt, daß viele menschliche und tierische Tumoren tumorassoziiertes Antigen (TAA) aufweisen, das vom Immunsystem des Tumorträgers als fremd erkannt wird (57,64,89). In wenigen Fällen kann diese Immunreaktion Tiertumoren erfolgreich eliminieren (13,114). Hierzu können eine Reihe unterschiedlichster Mechanismen wie Cytolyse und Cytostase in vivo beitragen (72). In vitro können diese Mechanismen, die durch TAA ausgelöst werden, genauer differenziert werden. So spielen Antikörper (14), sensibilisierte T-Zellen (61), aktivierte Macrophagen und Monocyten, sowie Toxine, die durch diese Zellen produziert werden (116), und "natürliche Killerzellen" eine Rolle (117). Ob diese Mechanismen in vivo von Bedeutung sind, bleibt zu klären. Wahrscheinlich wirken alle Mechanismen in der Tumoralabwehr zusammen.

Auf der zellulären Seite kooperieren verschiedene Zellpopulationen, wobei mononukleäre Zellen vor allem im Sinne der "delayed hypersensitivity" und als Entzündungszellen funktionieren, während sog. cytotoxische T-Zellen spezifisch am TAA ansetzen und mittels antigenspezifischer Rezeptoren das Target lysieren (90). Eine Killerzelle kann mehrmals lysieren (91) und verliert nur langsam ihre gewünschte Wirkung.

Es wäre nun denkbar, daß ein Versagen der Immunüberwachung das fortschreitende Wachstum eines Tumors zur Folge hätte. Dafür bieten sich folgende Erklärungen nach dem heutigen Stand der Wissenschaft an:

1. Fehlen tumorassoziierter Antigene (TAA), die vom Wirt erkannt werden könnten (82).
2. Entwicklung einer spezifischen Immuntoleranz gegenüber bestimmten Tumoren (122).
3. Immunsuppression bzw. Schwächung des allgemeinen Immunstatus eines Primärwirts: Patienten, die immunsuppressiv behandelt wurden, erkrankten häufiger an Malignomen - vor allem an lymphoretikulären Tumoren (3,99).
4. Veränderung der antigenen Beschaffenheit eines Tumors (Immenselektion).
5. Mangelndes Gleichgewicht zwischen Tumorwachstum und Immunreaktion des Wirtes. Verschiedene Untersuchungen ergaben, daß für die Induktion einer Immunreaktion eine gewisse Zellzahl notwendig ist. Unterschreitet man diese, so wächst der Tumor wegen der mangelnden Stimulation des Immunsystems unbemerkt im Organismus; dieses Phänomen bezeichnet man als "sneaking through" (99,104). Hat der Tumor dagegen eine gewisse Größe erreicht, dann überschreitet die Geschwindigkeit der Tumorzellproliferation die Produktion von Antikörpern bzw. cytotoxischen Zellen. Dies führt zu einer Erschöpfung des Immunsystems, folglich kann der Tumor beschleunigt wachsen (95).
6. Tumorwachstum an privilegierten Stellen z.B. Backentasche des Hamsters (66) oder Augenvorderkammer bzw. eventuell das Gehirn (99).
7. Begünstigung des Tumorwachstums (Enhancement)
Kaliss induzierte bei Mäusen das Wachstum von Tumoren, die normalerweise von diesen Tieren abgestoßen wurden (74,75,76). Dazu behandelte er die Empfänger entweder mit einem Antiserum, das für diesen Tumor spezifisch war (passives Enhancement) oder mit wiederholten Injektionen von antigenem Material des Tumors (aktives Enhancement). Durch diese Immunisierung wurde das Tumorwachstum begünstigt - ein Effekt, der auf das Vorhandensein von Faktoren zurückgeführt wird, die das Immunsystem blockieren (19,61). Es herrschen unterschiedliche Meinungen

darüber, ob es sich bei dem blockierenden Faktor um Immunglobulin (61) oder um Antigen-Antikörperkomplexe (6, 123) handelt, die den Tumor "maskieren", und dadurch die Reaktion des zellulären Immunsystems mit dem Tumor verhindern.

8. Induktion von Suppressorzellen, die eine wirksame Immunantwort verhindern.

Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Immunreaktion auf einen Tumor nicht nur zur Bildung von "Killerzellen" führt, die gegen den Tumor gerichtet sind (16,27,61), sondern daß gleichzeitig auch Suppressorzellen induziert werden (4,32,46,52,100). Pope teilt diese in zwei Hauptgruppen ein (108): in spezifische Suppressorzellen, die nur die Immunantwort auf das Antigen supprimieren, gegen das sie sensibilisiert worden sind, und in unspezifische Suppressorzellen, die die Immunantwort generell inhibieren. Ersteren scheinen nur T-Lymphozyten anzugehören, letzteren werden T-, B-Lymphozyten und Macrophagen zugeordnet. Man nimmt an, daß die Suppressorzellen auf zwei Wegen das Immunsystem supprimieren. Sie inhibieren einmal die Reaktion der B-Zellen mit dem Antigen und damit die Produktion von Immunglobulin (9); zum anderen schränken sie die Aktivitäten anderer T-Zellen ein (42,50). Diese Suppression kann antigenspezifisch (9), aber auch antigenunspezifisch sein (113).

Bezüglich der beiden letzten Punkte- Tumor-Enhancement und Induktion von Suppressorzellen - scheint vor allem der Milz besondere Bedeutung zuzukommen. Die Milz soll eine wichtige Quelle für humorale Antikörper sein (1,115), und man nimmt daher an, daß in ihr auch sogenannte "enhancing antibodies" gebildet werden, die den Tumor "maskieren" und dadurch sein Wachstum fördern (36,37,98,105). Außerdem werden in der Milz und im Thymus tumortragender Tiere schon 24 Stunden nach Tumorgabe sogenannte Suppressor-Lymphozyten gefunden, die die Abstoßung des Tumors durch Killer-T-Lymphozyten verhindern und damit sein Wachstum

unterstützen (43,45).

In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Milz auf das Wachstum von transplantablen Mäusemelanomen hat. Die Beeinflussung des Tumorwachstums durch Splenektomie und Transfer von Lymphozyten wurde weitgehend in vivo untersucht, da in vivo-Experimente die natürliche Entwicklung einer Immunantwort während des Tumorwachstums am besten nachvollziehen. Obwohl in vitro-Versuche gewisse Vorteile haben, scheinen sie nicht immer adäquat das Verhalten der Lymphozyten in vivo wiederzuspiegeln. Milzzellsuspensionen, die in vitro sensibilisiert wurden, zeigten z.B. in vitro einen hohen cytotoxischen Effekt, während sie in vivo das Tumorwachstum förderten, d.h. einen "Tumorenhancing-Effekt" ausübten (70,129).

1. In vivo-Versuche

1.1 Splenektomie ohne Tumorgabe

In einer Langzeitstudie über ca. 3 Jahre wurde der Einfluß der Splenektomie auf die Überlebenszeit von Mäusen und das Auftreten von spontanen Tumoren untersucht. Die Splenektomie verkürzt in beiden Linien zu keinem Zeitpunkt, d.h. auch nicht unmittelbar postoperativ, die Überlebenszeit der Tiere (Abb. 3a+b). Die Mäuse starben hauptsächlich an Altersschwäche. Spontane Tumoren traten nur vereinzelt auf und waren in allen Gruppen gleichmäßig verteilt (Tab. 15). Die genaue Histologie der Tumoren wurde nicht untersucht, doch waren makroskopisch in fast allen Fällen hauptsächlich lymphatische Organe befallen.

Tabelle 15: Anzahl der Tumoren in splenektomierten (Sx) und un-
behandelten (Ko) Tieren aus hoher (HL) bzw. niederer
(NL) Linie

	Anzahl der Tumoren	Art
Sx (HL) n=27	2	unbekannt
Ko (HL) n=35	1	V.a. Leukose
Sx (NL) n=27	2	1 Geschwulst a. Bauch 1 V.a. Leukose
Ko (NL) n=26	2	1 V.a. Leukose 1 V.a. Lymphosarkom

Frühere Untersuchungen an demselben Tiermaterial zeigten, daß Mäuse mit hohem Milzgewicht eine erhöhte Resistenz gegenüber Listerieninfektionen aufwiesen und höhere Antikörpertiter gegen Schafer erythrozyten bilden konnten (15). Um so mehr verwundert die Beobachtung, daß die Tiere mit vergleichsweise geringem Milzgewicht in der Langzeitstudie signifikant längere Überlebenszeiten als die hohe Linie aufweisen. Nach 705 Tagen sind alle Tiere der hohen Linie gestorben, während noch 81% der Tiere mit kleiner Milz leben (Abb. 4a+b).

1.2. Splenektomie mit Tumorgabe

Untersuchungen von Meyer und Witting (94) ergaben, daß das Auftreten spontaner (Mamma-Carcinom) und chemisch induzierter (3,4-Benzpyren) Tumoren deutlich vom Ausgangsgewicht der Milz beeinflusst wurde (Abb. 27a+b). Im Alter von 650 Tagen entwickelten 57% der weiblichen Tiere aus der hohen, hingegen nur 20% aus der niederen Linie ein Mamma-Carcinom. Ein ähnlicher Effekt wurde beim 3,4-Benzpyren induzierten Sarkom beobachtet. Ohne Geschlechtsunterschiede konnte hier nach 105 Tagen bei 65% der hohen und nur bei 19% der niederen Linie ein Malignom festgestellt werden.

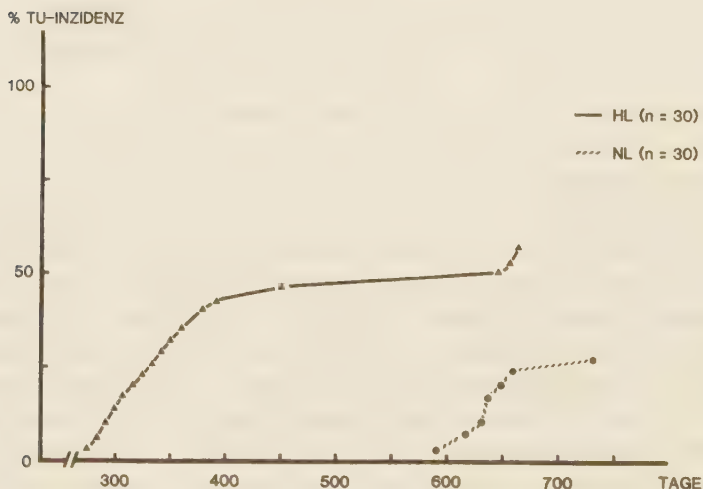


Abb. 27a: Tumorinzidenz (spontanes Mamma-Carcinom) bei weiblichen Mäusen in hoher (HL) und niederer Linie (NL)

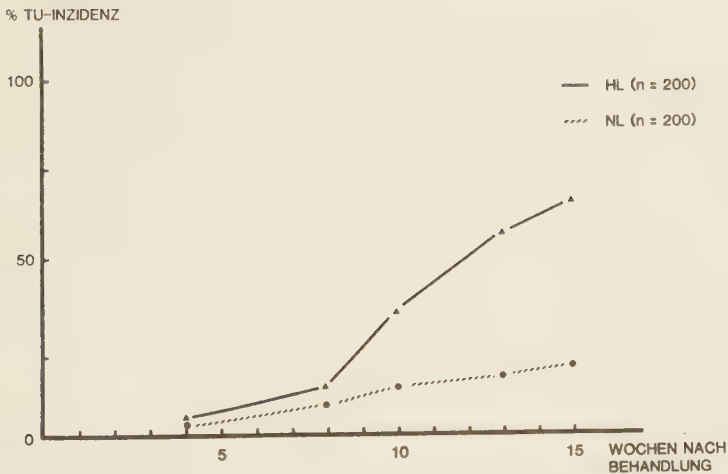


Abb. 27b: Tumorzinzidenz (3,4-Benzpyren-induz. Sarkom) in hoher (HL) und niederer (NL) Linie (50% ♂, 50% ♀)

Hingegen kann man im Falle der beiden transplantablen Tumoren zwischen Mäusen mit hohem und niederem Milzgewicht keinen Unterschied in dieser Deutlichkeit feststellen. Das B₁₆-Melanom tritt zwar während des gesamten Versuchs ebenfalls häufiger in der hohen Linie auf (Abb. 7a+b), doch sind die Unterschiede nicht so bemerkenswert wie bei chemisch induzierten und spontanen Tumoren. Das H.P.-Melanom dagegen zeigt in beiden Linien gleich hohe Inzidenzen (Abb. 12a+b).

Dieser Unterschied zwischen spontanen und chemisch induzierten Tumoren einerseits und transplantablen Melanomen andererseits

könnte auf deren verschiedene Genese zurückzuführen sein. Während sich das Mamma-Carcinom und das 3,4-Benzpyren induzierte Sarkom spontan aus einer bzw. aus mehreren alterierten Zellen entwickelt, werden im Falle der transplantablen Malignome ca. 2×10^6 B¹⁶ - bzw. H.P.-Melanomzellen in einer einzigen Dosis injiziert. Durch die akut hohe Tumorbelastrung und die hohe Proliferationsrate der inoculierten Zellen könnte die Kapazität des Immunsystems erschöpft werden, so daß der mögliche Einfluß, den das niedrigere Milzgewicht auf spontane bzw. chemisch induzierte Tumoren ausübt, nicht in dem Maße zur Geltung kommen kann. Versuche von Nordlund (103) zeigten, daß die Milz das Immunsystem bei der Abwehr von Malignomen unterstützt, wenn eine geringe Zellzahl gegeben wird. Hingegen supprimiert sie die Immunabwehr bei hohen Zelldosen, d.h. wenn die Antigenbelastung zu groß wird.

Um diesen möglichen Einfluß der Milz weiter zu untersuchen, wurden splenektomierte und scheinoperierte Tiere hinsichtlich der Tumorangehrate verglichen. Im Falle des B¹⁶ -Melanoms hatte die Splenektomie zwar auf Inzidenz und zeitliches Auftreten der Tumoren keinen supprimierenden Effekt (Abb. 8,9a+b), doch waren in einigen Gruppen signifikant niedrigere Tumorgewichte bei den splenektomierten Mäusen zu beobachten (Tab. 8). Dies könnte darauf hindeuten, daß das B¹⁶ -Melanom durch die Milzextirpation im Wachstum supprimiert wird.

Der Zeitraum bis zum klinischen Auftreten des H.P.-Melanoms wurde ebenfalls durch die Splenektomie weder verkürzt noch verlängert (Abb. 13). Bei thymektomierten und immunsupprimierten Tieren hingegen treten Tumoren signifikant früher und häufiger als bei Kontrollen auf (103). Der Thymus scheint daher bei der Abwehr von Tumoren eine bedeutende Rolle in der Immunantwort zu spielen. Die Milz hingegen übt beim H.P.-Melanom einen tumorprotektiven Effekt aus, da die Inzidenz dieses Melanoms durch die Splenektomie signifikant gesenkt werden konnte (Abb. 14). Die Milz scheint in diesem Fall das Immunsystem zu supprimieren, so daß das Malignom die Barriere der "Immunsurveillance" leichter überwinden kann.

Gershon und Carter beobachteten zwei Effekte der Milz (47): Anfangs entwickelten sich die Tumoren bei splenektomierten Hamstern langsamer als bei den Kontrollen, im weiteren Verlauf dann hingegen schneller, d.h. die Immunantwort der splenektomierten Tiere war bei fortgeschrittenem Tumorwachstum schwächer ausgeprägt. Diese Ergebnisse wurden von Fightlin bei Mäusen bestätigt (41). Zahlreiche andere Untersuchungen zeigen ebenfalls, daß die Milz das Angehen von Tumoren begünstigen kann. Splenektomie konnte die Abstoßung des S-180-Sarkoms bei Schweizer-Mäusen signifikant beschleunigen (105), bzw. das Wachstum dieser Tumoren bei AKR-Mäusen, die mit Tumorphomogenaten vorbehandelt worden waren, verhindern (36). Pollack beobachtete bei splenektomierten Mäusen eine erhöhte Abstoßung von Malignomen, die durch das Moloney-Sarkom-Virus induziert worden waren (107). Ebenso konnte die Inzidenz von Ehrlich-Aszites-Tumoren gesenkt werden bzw. eine Splenektomie als therapeutische Maßnahme, d.h. nach klinischem Auftreten des Malignoms, zur Regression desselben führen (106). Dieser positive Effekt der Milzextirpation scheint jedoch auch von der Tumordosis abhängig zu sein. Chang stellte fest, daß der Einfluß der Splenektomie nur bei einer Dosis von $10^3 - 10^4$ Tumorzellen wirksam wird (20). Auch bei splenektomierten Mäusen wurde eine geringere Angehrate Benzpyren-induzierter Sarkome beobachtet als bei scheinoperierten Tieren (134). Da sich auch in diesem Fall der Tumor aus einigen wenigen Zellen entwickelt, könnte diese Beobachtung das Ergebnis von Chang bestätigen.

Für diesen Effekt der Milzextirpation werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Da die Milz für die Produktion oben beschriebener "enhancing antibodies" verantwortlich gemacht wird (36,37,105), könnte Splenektomie dies verhindern, so daß der tumorprotektive Effekt verschwindet (7,63,98). Check beobachtete eine geringere Inzidenz von spontanen bzw. transplantierten Malignomen in niedriger Dosierung (4×10^4 Zellen), wenn er Mäuse splenektomierte und zusätzlich mit denaturierten Tumorzellen

immunisierte (22). Er postuliert, daß die denaturierten Zellen die humorale und zelluläre Immunantwort stimulieren. Außerdem werden durch die Milzextirpation "enhancing antibodies" und Antigen-Antikörperkomplexe, die den Tumor "maskieren" könnten, reduziert, so daß sein Wachstum supprimiert wird.

1.3 Transfer von Milz-Lymphozyten

Um diesen tumorprotektiven Einfluß der Milz, der durch Splenektomie verschwindet, näher zu untersuchen, wurden Milz-Lymphozyten, die vier Tage Tumorantigen-spezifisch sensibilisiert worden waren, auf Tiere übertragen, die gleichzeitig B¹⁶-Melanomzellen i.m. erhielten. Dadurch wurde im Vergleich zu den Kontrollen in beiden Linien die Tumorzinzidenz signifikant erhöht (Abb. 15a+b) bzw. das Auftreten des Melanoms beschleunigt (Abb. 16). In der Milz scheinen also schon frühzeitig (4-5 Tage nach Tumorgabe) Zellen zu generieren, die einen Enhancement-Effekt auf das Tumorstwachstum ausüben, was in Einklang mit anderen Publikationen steht (48,128).

Dieser Beobachtung in vivo stehen unterschiedliche in vitro-Untersuchungen gegenüber. Einerseits konnten Splenocyten in vitro die "natural killer cell"-Aktivität inhibieren (118) bzw. im Verlauf des Tumorstwachstums einen sogenannten "suppressor factor" produzieren, wozu Lymphozyten aus Lymphknoten nicht in der Lage waren (127). Dieser "suppressor factor", der im Überstand von kultivierten Milzzellen tumortragender Tiere gefunden werden konnte, erhöhte die Malignominzidenz, wenn er, zusammen mit Tumorzellen incubiert, auf andere Mäuse übertragen wurde (71,88). In anderen Studien wirkten sensibilisierte Milz-Zellen in vitro cytotoxisch, in vivo hingegen tumorprotektiv (70,129). Schechter wiederum zeigte, daß nach längerer Incubationszeit in vitro der "enhancing"-Effekt der Splenocyten in einen cytotoxischen übergeht (120).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten darauf hindeuten, daß im Verlauf des Tumorwachstums neben der Proliferation von cytotoxischen T-Lymphozyten auch sogenannte Suppressorzellen induziert werden, und somit die Immunantwort auf den Tumor vom zahlenmäßigen Verhältnis dieser beiden Zelltypen zueinander abhängt. Dutton behauptet, daß Suppressorzellen instabil und damit unfähig sind, in vitro über längere Zeit suppressiv zu wirken, wodurch der Effekt der cytotoxischen Zellen überwiegt (31). Auch andere Untersuchungen zeigen, daß der Einfluß der Suppressorzellen in vitro in den ersten Tagen nach Sensibilisierung am stärksten zu sein scheint, um dann im weiteren Verlauf abzunehmen (32).

Dies kann in vorliegender Arbeit in vivo bestätigt werden, da sensibilisierte Lymphozyten vom Tag 10 die Tumorzinzidenz nicht mehr erhöhen (Abb. 17a+b). Jedoch könnten - allerdings in geringerer Anzahl - immer noch Suppressorzellen vorhanden sein, die die Immunantwort inhibieren, da die Tumoren bei den sensibilisierten Tieren weiterhin früher auftreten (Abb. 18). Eventuell könnte dieser supprimierende Effekt auf das Immunsystem ganz verschwinden, wenn die Lymphozyten vor dem Transfer noch einige Zeit länger in vivo sensibilisiert werden. Spellmann (126) beobachtete nach 15-30 Tagen ein Abnehmen der suppressiven Wirkung. Entfernt man hingegen den Tumor, konnte schon innerhalb von fünf Tagen ein Verschwinden der Suppressorzellen bemerkt werden (45).

1.4. Transfer von Thymus-Lymphozyten

Über den Zelltyp, dem diese Suppressorzellen in der Milz angehören, herrschen kontroverse Meinungen. Es werden Macrophagen (78,109,135), B-Lymphozyten (52) oder T-Lymphozyten (32,46,100) bzw. Kombinationen dieser Populationen (35,108) diskutiert, aus denen sich Suppressorzellen entwickeln.

Um diese Frage zu beantworten, wurden in einem weiteren Experiment sensibilisierte Thymozyten, die zu 98% T-Lymphozyten ent-

sprechen, i.p. auf Tiere übertragen, denen gleichzeitig B₁₆-Melanomzellen i.m. injiziert wurden. Auch in diesem Fall wird die Tumorzinzidenz der sensibilisierten Tiere in hoher und niederer Linie signifikant erhöht (Abb. 19a+b). Dieses Ergebnis korreliert mit dem anderer Untersucher, die die Suppressorzellen als Subpopulationen von T-Lymphozyten betrachten. Treves incubierte Splenocyten mit anti-Theta-Serum plus Komplement, um die T-Lymphozyten zu eliminieren. Da daraufhin die suppressive Aktivität der transferierten Milz-Zellen verschwand, und das Tumorstadium si-stierte, folgte er, daß die Suppressorzellen den T-Lymphozyten zuzuordnen seien (129). In späteren Publikationen konnte gezeigt werden, daß Suppressorzellen das Thy 1-Antigen auf ihrer Zelloberfläche tragen und daher spezifisch mit anti-Thy 1-Serum plus Komplement eliminiert werden können (25,73).

Obwohl beide Zellpopulationen - sensibilisierte Thymozyten und Splenocyten - die Immunantwort supprimieren, üben in eigenen Versuchen vermutlich doch die Lymphozyten aus der Milz einen noch stärkeren tumorprotektiven Effekt aus, da sie neben der Erhöhung der Inzidenz auch das zeitliche Auftreten des B₁₆-Melanoms beschleunigen (Abb. 16). Sensibilisierte Thymozyten hingegen haben keinen Einfluß auf die Latenzzeit bis zum klinischen Erscheinen der Tumoren (Abb. 20). Es könnten also eventuell doch neben den Suppressor-T-Lymphozyten auch andere Zellen bzw. Zellprodukte in der Milz, jedoch nicht im Thymus, vorkommen, die die Immunantwort supprimieren, wie z.B. Macrophagen oder "enhancing antibodies".

Die Proliferation von Suppressorzellen scheint durch das Melanomwachstum aktiviert zu werden, da die Tumorzinzidenz der Tiere, die Thymozyten von unbehandelten Mäusen erhielten, im Vergleich zu Kontrollen, denen nur Melanom-Zellen injiziert worden waren, nicht erhöht war (Abb. 19a). Ob die Induktion dieser Suppressorzellen allerdings Tumorantigen-spezifisch ist, wie vereinzelt behauptet wird (43,80), müssen weitere Untersuchungen klären.

Der Mechanismus, durch den die Suppressorzellen zur Proliferation aktiviert werden, ist bis heute unklar. Man nimmt an, daß Tumorantigen allein oder als Antigen-Antikörperkomplex die Entwicklung von Suppressorzellen induziert (10,62). Für die Aktivierung dieser Zellen scheint Thymusgewebe unbedingt notwendig zu sein, da in thymektomierten (49) bzw. in sogenannten "B-Mäusen", d.h. in Tieren, denen das Thymus-abhängige Zellkompartiment fehlt (100), keine Suppressoraktivität nachweisbar ist.

Die Suppressorzellen könnten auf zwei Wegen wirksam sein: sie stimulieren entweder direkt das Tumorstadium oder aber sie supprimieren systemisch die Immunantwort des Organismus. Um diese Frage zu klären, wurden die Lymphozyten aus Milz und Thymus in vorliegender Arbeit i.p. injiziert, während der Tumor i.m. transplantiert wurde. In den meisten anderen Publikationen hingegen wurden Tumorzellen und Lymphozyten in vitro incubiert, um dann gemeinsam inoculiert zu werden (18, 129). Der tumorprotektive Einfluß war immer vorhanden (Abb. 15a+b, 16, 19a+b), obwohl nie ein direkter Kontakt zwischen den Zellen in vitro stattgefunden hatte. Daher unterstützen sensibilisierte Lymphozyten das Tumorstadium, indem sie vermutlich systemisch die Immunantwort supprimieren. Diese Hypothese wird durch Versuche von Manor (88) bestätigt, der allerdings keine Lymphozyten, sondern den Überstand von sensibilisierten Milzzellen i.p. inoculierte. Treves kam mit Hilfe eines anderen Experimentes zu demselben Ergebnis (129). Er bestrahlte Mäuse mit 450r bzw. 750r, um ihnen dann Tumoren und sensibilisierte Splenocyten zu injizieren. Daraufhin erhöhten diese im Vergleich zu Kontroll-Lymphozyten signifikant die Tumorzinidenz der Tiere, die mit 450r bestrahlt worden waren. Mäuse, die mit 750r bestrahlt worden waren, unterschieden sich jedoch nicht in der Tumorangehate - gleichgültig, ob sie Lymphozyten von tumortragenden oder Kontrollmäusen erhielten. Dies zeigt ebenfalls, daß die Suppressorzellen wahrscheinlich nicht direkt das Tumorstadium stimulieren, sondern daß sie es fördern, indem sie die Immunabwehr supprimieren.

Über die Art und Weise, wie die Suppressorzellen das Immunsystem inhibieren, gibt es unterschiedliche Meinungen. Einmal verhindern sie unspezifisch die Proliferation von T-Lymphozyten nach Gabe von T-Zell-Mitogenen (52,78), andererseits scheinen sie tumorspezifisch zu sein (43,44,80). Ob die spezifische bzw. unspezifische Suppression eventuell durch verschiedene Zelltypen vermittelt wird, ist ebenfalls nicht bekannt, obwohl Pope (108) die Suppressorzellen in der Milz in zwei Klassen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen unterteilt. Schechter (119) wiederum postuliert, daß die Suppressorzellen entweder cytotoxische T-Lymphozyten in einem inaktiven, nicht funktionsfähigen Stadium stagnieren lassen oder aber einen sogenannten "blocking factor" sezernieren, der die Tumorzelle maskiert.

1.5 Untersuchung der Milz

Die Kontrollmilzen beider Linien unterscheiden sich zwar hinsichtlich ihrer Gewichte signifikant (Tab. 9), doch können histologisch keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Während sich die einzelne lymphatische Zelle in ihrer Phagozytosefähigkeit und immunologischen Abwehr in großer und kleiner Milz nicht unterscheidet, werden die Phagozytosefähigkeit und Immunantwort des gesamten Organismus durch die relative Zu- bzw. Abnahme der Milzgröße entscheidend beeinflusst (15).

Melanomtragende Mäuse zeigen 28 Tage nach Tumorgabe eine signifikante Splenomegalie in allen Gruppen (Tab. 9), was auch von anderen Autoren beobachtet wurde (80,101,135). Diese Vergrößerung könnte als spezifische Immunantwort auf das Tumorstadium angesehen werden. Die Tatsache, daß die Milz in so kurzer Zeit an Gewicht zunimmt, zeigt die wichtige Rolle, die sie möglicherweise bei der Regulation der Immunantwort auf Tumorantigene spielt (41,80). Hingegen beruht die Splenomegalie nicht auf einer Metastasierung des Melanoms, was histologisch bestätigt wurde.

Allerdings findet man in den Milzen tumortragender Tiere vergrößerte Lymphfollikel, die Keimzentren aufweisen (Abb. 22). Auffällig sind neben Granulozyten und unreifen myeloischen Zellen haufenförmig angeordnete Lymphozyten in der roten Pulpa, die man in den Milzen von Kontrolltieren nicht findet. Dies könnte Ausdruck einer gesteigerten Zellproliferation als Reaktion auf die Tumorbelastung sein und darauf hindeuten, daß T- und B-Lymphozyten nicht nur in ihren spezifischen Regionen - Follikel und parakortikale Bereiche -, sondern auch in der roten Pulpa miteinander reagieren und Informationen austauschen. Eine verstärkte Hämatopoese, wie sie in anderen Arbeiten gefunden wurde (77,101), konnte dagegen nicht beobachtet werden.

1.6. Tumorinzidenz bei genetisch bedingt milzlosen Mäusen

Da die vorausgegangenen Versuche zeigten, daß die Milz die Immunantwort auf Tumoren erheblich beeinflußt, sollte nun untersucht werden, wie sich Mäuse, die ohne Milz geboren werden, hinsichtlich der Angehrate von Tumoren verhalten. Auch in diesem Fall ist im Vergleich zu den Kontrollen mit Milz die Inzidenz des B₁₆-Melanoms bei den milzlosen Tieren erniedrigt (Abb. 23). Die geringere Angehrate korreliert mit einer längeren Latenzzeit bis zum klinischen Auftreten der Tumoren (Abb. 24). Um die Ursache dieser Beobachtung zu beurteilen, müßten allerdings weitere Versuche unternommen werden. Bisher waren jedoch zu wenige dieser sehr seltenen Tiere vorhanden. Es wäre auch in diesem Fall denkbar, daß aufgrund der Milzagenesie eine geringere Anzahl von Suppressorzellen induziert wird, so daß die Immunabwehr das Tumorstadium inhibieren kann.

Andere Arbeiten zeigten (87), daß Haut- und Milztransplantate von milzlosen Mäusen ebenso schnell wie von Kontrolltieren abgestoßen werden können, was auf eine intakte zellulär-vermittelte Immunantwort der milzlosen Mäuse hinweist. Untersucht man das

Knochenmark dieser Tiere (86), so findet man dort eine verstärkte Proliferation von Lymphozyten. Dies wird bei thymektomierten bzw. lymphadenektomierten Mäusen nicht beobachtet, es sei denn, man splenektomiert sie gleichzeitig (11). Da die Milz ein Pool für Lymphozyten ist, könnte ihr Fehlen eine kompensatorische Hyperplasie des Knochenmarks oder des Thymus bewirken, die daraufhin vermehrt Lymphozyten produzieren. Dies erklärt vermutlich die signifikante Leukozytose der milzlosen Tiere (Tab. 10). Die operative Entfernung der Milz verursacht ebenfalls eine Leukozytose, die wie bei den milzlosen Tieren auf einer relativen Lymphozytose beruht (86). In milzlosen und splenektomierten Mäusen sind 75-80% der Gesamtleukozytenzahl Lymphozyten. Der größte Teil (77%) soll aus dem Thymus stammen, wohingegen der Rest (23%) seinen Ursprung im Knochenmark hat (38). In Meerschweinchen werden nach Splenektomie vermehrt Thymus-abhängige Lymphozyten gefunden (34a) und umgekehrt nach Thymektomie vermehrt Lymphozyten aus der Milz (34b).

2. In vitro Versuche

2.1. Direkte Immunfluoreszenz

Zahlreiche Studien geben Grund für die Annahme, daß wachsende Tumoren die Immunabwehr des Organismus beeinflussen (5,104). Malignome induzieren vor allem die zellulär-vermittelte Immunantwort, die sich im Verlauf des Tumorwachstums ändert (80). T- und B-Lymphozyten sind daran beteiligt - die T-Zellen vor allem als Helfer-, Killer- und Suppressorzellen, die B-Lymphozyten als Vorläufer von Plasmazellen, die humorale Antikörper produzieren (54).

Um das Verhalten dieser Zellpopulationen unter Tumorbelastrung zu untersuchen, wurde der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten in Milz und Lymphozyten immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Melanomtragende Tiere haben einen signifikant höheren B-Zellan-

teil in den Lymphknoten, und auch die Milz dieser Mäuse enthält mehr B-Lymphozyten als Tiere, die nur Kochsalz bekamen bzw. die trotz Tumorgabe kein Melanom entwickelten (Tab. 12b + 13). Hingegen wird der prozentuale B-Zellanteil in den Lymphknoten weder durch Splenektomie (Tab. 12a) noch durch Agenesie der Milz (Tab. 13) beeinflusst. Dies würde bedeuten, daß der tumorprotektive Einfluß der Milz, der durch Splenektomie verschwindet, nicht in Zusammenhang mit einer Veränderung des B-Zellanteils gebracht werden kann.

Witting (134) hingegen beobachtete eine Abnahme der B-Lymphozyten nach Splenektomie, wodurch er die Tumorzinzidenz bei Mäusen signifikant senken konnte. Die Milz dieser Mäuse hatte allerdings einen Anteil von 80% B-Lymphozyten. Er folgerte daraus, daß die B-Zellen T-Lymphozyten supprimieren und durch die Extirpation der B-Zell-reichen Milz die T-Lymphozyten besser proliferieren können, wodurch die zelluläre Immunantwort verbessert wird.

Studien von Lozzio (87) zeigten, daß der IgM-Spiegel im Blut von splenektomierten und milzlosen Tieren erniedrigt, der IgG₁-Spiegel bei milzlosen Mäusen jedoch signifikant erhöht ist. Auch die Serumproteinkonzentration ist bei milzlosen Mäusen niedriger als bei Kontrolltieren (86). Diese Befunde korrelieren mit gehäuften Infektionen (24), die auch bei splenektomierten Patienten vermehrt auftraten (56). Man beobachtete vor allem Bronchopneumonien, Pleuritiden, subphrenische Abszesse und eine gestörte Wundheilung (83), insgesamt vermehrt Frühkomplikationen, während Spätkomplikationen nur selten auftraten. Dies könnte mit einem vorübergehenden Mangel an IgM im Serum dieser Patienten nach Splenektomie erklärt werden, wodurch bekanntlich die frühe Immunantwort gestört wird. (17,83).

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Einfluß des größten lymphatischen Organs, der Milz, auf das Wachstum zweier transplantabler Tumoren - B₁₆-Melanom und Harding-Passey-Melanom - wurde untersucht.
2. Als Versuchstiere dienten Mäuse, die in einem Zwei-Linien-Selektionsexperiment auf Tuscheausscheidungsvermögen in Tiere mit großer Milz (Hohe Linie) und Tiere mit kleiner Milz (Niedere Linie) gezüchtet worden waren.
3. Splenektomie allein hat keinen Einfluß auf die Überlebenszeit der Tiere in beiden Linien.
4. Mäuse der niederen Linie (kleine Milz) erreichen ein signifikant höheres Alter als Tiere der hohen Linie (große Milz).
5. Das B₁₆-Melanom tritt in der hohen Linie häufiger als in der niederen Linie auf.
6. Splenektomie hat zwar keinen Einfluß auf Inzidenz und zeitliches Auftreten des B₁₆-Melanoms, doch wird das Wachstum des Tumors inhibiert, was sich in einem geringeren Tumorgewicht der splenektomierten Tiere äußert.
7. Splenektomie senkt signifikant die Inzidenz des Harding-Passey-Melanoms.
8. Transfer von sensibilisierten Milz-Lymphozyten, die vier Tage Tumorantigen-spezifisch sensibilisiert worden waren, erhöht signifikant die Tumorzinidenz des B₁₆-Melanoms in beiden Linien und verkürzt die Latenzzeit bis zum klinischen Auftreten des Malignoms. Dieser Effekt nimmt mit zunehmendem Tumorzwachstum ab, da der Transfer von Milz-Lymphozyten, die zehn Tage

Tumorantigen-spezifisch sensibilisiert worden waren, die Inzidenz nicht mehr erhöht.

9. Transfer von Thymus-Lymphozyten (98% T-Lymphozyten), die fünf Tage Tumorantigen-spezifisch sensibilisiert worden waren, erhöht ebenfalls die Inzidenz des B₁₆-Melanoms in beiden Linien. Die Latenzzeit bis zum klinischen Auftreten der Tumoren wird nicht beeinflusst.
10. Hohe und niedere Linie unterscheiden sich signifikant hinsichtlich der Milzgewichte, doch sind histologisch keine Unterschiede nachweisbar. Tumorstadium bewirkt eine signifikante Splenomegalie in beiden Linien, die nicht auf einer Metastasierung beruht. Histologisch findet man vergrößerte Lymphfollikel und eine gesteigerte Proliferation von Lymphozyten in der roten Pulpa.
11. Milzagenesie erniedrigt die Tumorzinzidenz des B₁₆-Melanoms und verlängert die Latenzzeit bis zum klinischen Auftreten der Tumoren; das Harding-Passey-Melanom wird hiervon nicht beeinflusst. Milzlose Mäuse zeigen eine signifikante Leukozytose im peripheren Blut.
12. Der prozentuale Anteil an B-Lymphozyten ist in Milz und Lymphknoten melanomtragender Tiere erhöht. Splenektomie und Milzagenesie hingegen beeinflussen den Anteil an B-Lymphozyten nicht.

In der Milz und im Thymus scheinen unter Melanomwachstum Zellen zu generieren, die einen tumorprotektiven Effekt ausüben. Diese sogenannten Suppressorzellen gehören vermutlich einer Subpopulation der T-Lymphozyten an. Sie werden durch den Tumor zur Proliferation aktiviert und unterstützen das Melanomwachstum, indem

sie spezifisch die Immunabwehr supprimieren. Dieser Effekt ist auf andere Tiere übertragbar. Unter der Annahme, daß unter Tumorbelastrung die Generation solcher suppressiver Zellen in dem größten lymphatischen Organ, der Milz, erfolgt, wäre die erniedrigte Tumorrates nach Splenektomie zu erklären.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADLER, F.L. Studies on mouse antibodies.
I. The response to sheep red cells.
J. Immunol. 95: 26 (1965)
2. AHMED, A. Morphological and functional characteristics
HARE, J.A. of lymphoid cells from LHC hamsters.
SELL, K.W. Federation Proceedings 37.7:2045 (1978)
3. ALLISON, A.C. Immunological surveillance against tumor
 cells.
 Eigene Literatur (1977)
4. ARGYRIS, B.F. Activation of suppressor cells by syngeneic
 tumor transplants in mice.
 Cancer Res. 38: 1269 (1978)
5. BALDWIN, R.W. Immunobiology of rat neoplasia, Part I: Tu-
PRICE, M.R. mors as stimulators of the immune response.
 Ann. N.Y. Acad. Sci. 276: 3 (1976)
6. BALDWIN, R.W. Blocking of lymphocyte-mediated cytotoxici-
PRICE, M.R. ty for rat hepatoma cells by tumour-specific
ROBINS, R.A. antigen-antibody complexes.
 Nature (New Biol.) 238: 185 (1972)
7. BANSAL, S.C. Counteraction of the blocking of cell-medi-
SJÖGREN, H.O. ated tumor immunity by inoculation of un-
 blocking sera and splenectomy - Immunothera-
 peutic effects on primary polyoma tumors in
 rats.
 Int.J. Cancer 9: 490 (1972)

8. BARTAL,A. Cellular immunity in patients with laryngeal
GOLDSHER,M. cancer developing additional primary mali-
MEKORI,T. gnanant tumors.
ELIACHAR,I. Ann. of otology, rhinology and laryngology
ROBINSON,E. Vol. 88.3: 311 (1979)
9. BASTEN,A. Cell to cell interaction in the immune res-
MILLER,J.F.A. ponse, X. T-cell dependent suppression in
SPRENT,J. tolerant mice.
CHEERS,C. J. exp. Med. 140: 199 (1974)
10. BERCZI, I. Effector and suppressor lymphoid cells in
SEHON,A.H. tumor-bearing guinea-pigs.
Int.J. Cancer 23: 274 (1979)
11. BIERRING,F. Quantitative bone marrow studies in the rat
GRUNET,I. following a combination of subtotal splenec-
tomy, total thymectomy and extensive removal
of lymph nodes.
Acta Anat. 59: 182 (1964)
12. BIOZZI,G. Quantitative study of the granulopoietic ac-
BENACERRAF,B. tivity of the reticulo-endothelial system.
HALPERN,B.N. Brit. J. Exptl. Pathol. 34: 441 (1953)
13. BORBERG,H. Inhibition of established transplants of
OETTGEN,H.F. chemically induced sarcomas in syngeneic
CHOUDRY,K. mice by lymphocytes from immunized donors.
BEATTIE,E.J. Int.J. Cancer 10: 539 (1972)
14. BUCHSBAUM,D. Distinction of radiolabelled allo-antibodies
WACKER,P. in mice bearing 3-MCA induced sarcomas.
JOHANSON,E. Cancer Res. 39: 3363 (1979)

15. BUSCHMANN, H. Weitere Untersuchungen an Mäusen, welche auf
KRÄUSSLICH, H. hohes und niedriges Phagozytosevermögen selektiert worden sind.
MEYER, J.
RADZIKOWSKI, A. Zbl. Vet. Med. B. 23: 331 (1976)
OSTERKORN, K.
16. CANTOR, H. Functional subclasses of T-Lymphocytes bearing different Ly-antigens. II. Cooperation
BOYSE, E. A. between subclasses of Ly-cells in the generation of killer activity.
J. exp. Med. 141: 1390 (1975)
17. CHAIMOFF, C. Serum immunoglobulin changes after accidental splenectomy in adults.
DONER, D.
PICK, I. A. American J. surgery p. 332 (Sep. 1978)
PINKHAS, J.
18. CHANDRADASA, K. The correlation of the ongoing proliferative response to tumour in lymphoid organs with the anti-tumor activity of the lymphoid cells.
BARNES, R. M. R.
Europ. J. Cancer 14: 279 (1978)
19. CHANG, A. E. Abrogation of T-cell homing by alloantibody
SUGARBAKER, P. H. Transplantation 29.2: 127 (1980)
20. CHANG, R. W. S. Increased resistance in splenectomized mice to a methylcholanthrene-induced tumour.
TURK, J. L.
Brit. J. Cancer 35: 768 (1977)
21. CHAPERON, E. A. Migration of antibody-forming cells and antigen-sensitive precursors between spleen, thymus and bone marrow.
SELNER, J. C.
CLAMAN, H. N.
Immunology 14: 553 (1968)

22. CHECK, J.H. Protection against transplanted and spontaneous lymphoma by inoculation of heat-altered syngeneic tumor cells in splenectomized mice.
Cancer 34: 197 (1974)
23. CLAMAN, H.N. Thymus-marrow cell combinations: Synergism
CHAPERON, E.A. in antibody production.
TRIPLETT, R.F. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122: 1167 (1966)
24. COIL, J.A. Increased susceptibility of splenectomized
DICKERMANN, Y.D. mice to infection after exposure to an aerosolized suspension of type III Streptococcus pneumoniae.
BOULTON, E. Infection and Immunity, Vol. 21.2.: 412 (1978)
25. CONNOLLY, K.M. Reversal of macrophage-augmented MLR reactivity by tumor-induced splenic suppressor T-cells and their soluble factor(s).
ELGERT, K.D. Cell. Immunol. 44: 99 (1979)
26. COOPER, M.D. The development of the immune system.
LAWTON, A.R. III Sci. Am. 231: 58 (1974)
27. DENNERT, G. Thymus-derived killer-cells: Specificity of function and antigen recognition.
Transpl. Rev. 29: 59 (1976)
28. DESAIVE, C. Size dependence of cell cycle parameters
ZIETZ, S. for lung metastases from B₁₆-Melanoma.
NICOLINI, C. Cancer letters 4: 285 (1978)

29. DEUBELBEISS,K. Postmitotic marrow neutrophils and neutrophil mobilization in man: Role of the spleen.
ROTH,P.
Blood Vol. 52.5: 1021 (1978)
30. DULLENS,H.F. Comparison of various forms of therapy in
VENNEGOOR,C. two different mouse tumor systems.
DE WEGER,R.A. Canc. treatment reports 63: 99 (1979)
WOUTERSEN,F.
WOUTERSEN,R.A.
DEN OTTER,W.
31. DUTTON,R.W. Inhibitory and stimulatory effects of concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigen.
I. Characterization of the inhibitory cell activity.
J. exp. Med. 136: 1445 (1972)
32. DUTTON,R.W. Suppressor T-cells
Transplant. Rev. 26: 39 (1975)
33. DUTTON,R.W. Cell cooperation during immunologic responses of isolated lymphoid cells.
CAMPBELL,P. In "Cellular interactions in the immune
CHAN,E. response", p. 31, Karger, Basel 1971
HIRST,J.et al.
- 34a. ERNSTROM,U. Influence of splenectomy on thymic release of lymphocytes into the blood.
SANDBERG,G.
Scand. J. Haematol. 7: 342 (1970)
- 34b. ERNSTROM,U. Regulation of output of lymphocytes from
GYLLENSTEN,L. the spleen.
SANDBERG,G. Acta Path.Microbiol.Scand. 76: 43 (1969)

35. FARRAR,W.L. Inhibition of mitogen and immune blastogenesis by two distinct populations of suppressor cells present in the spleens of fibrosarcoma-bearing mice: adoptive transfer of suppression.
Int. J. Cancer 22: 142 (1978)
36. FERRER,J.F. Enhancement of the growth of sarcoma 180 in splenectomized and sham-operated AKR-mice.
Transplant. 6.2: 160 (1968)
37. FERRER,J.F. Role of the spleen in passive immunological enhancement.
Transplant. 6.2: 167 (1968)
38. FESTENSTEIN,H. Mouse blood lymphocyte origins investigated by a simple cell culture technique.
DAVIES,A.J.S. In "Lymphatic tissue and germinal centers in immune response", p.121, edited by L. WALLIS,V.J. Fiore-Donati and M.G. Hanna.
DOENHOFF,M.J. Plenum Press New York (1969)
39. FICHTELIUS,K.E. The afferent pathways of lymphocytes to the spleen.
BÄCK,O. Reprint from "The Spleen" by K. Lennert and D. Harms, p. 117, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970
40. FIDLER,I.J. Relationship of host immune status to tumor cell arrest, distribution and survival in experimental metastasis.
GERSTEN,D.M. Cancer 40: 46 (1977)
RIGGS,C.W.

41. FIGHTLIN,R.S. Splenic regulation of lymphocyte trapping
LYTTON,B. in lymph nodes draining tumor grafts.
GERSHON,R.K. J. Immunol. 115.2: 345 (1975)

42. FOLCH,H. The splenic suppressor cell. II. Suppres-
WAKSMAN,B.H. sion of the mixed lymphocyte reaction by
 thymus dependent adherent cells.
 J. Immunol. 113: 140 (1974)

43. FUJIMOTO,S. Immunosuppressor T-cells in tumor bearing
GREENE,M. hosts.
SEHON,A.H. Immunol. Comm. 4: 201 (1975)

44. FUJIMOTO,S. Regulation of the immune response to tumor
GREENE,M. antigens. I. Immunosuppressor cells in
SEHON,A.H. tumor-bearing hosts.
 J. Immunol. 116: 791 (1976)

45. FUJIMOTO,S. Regulations of the immune response to tu-
GREENE,M. mor antigens. II. The nature of immuno-
SEHON,A.H. suppressor cells in tumor-bearing hosts.
 J. Immunol. 116: 800 (1976)

46. GERSHON,R.K. A disquisition on suppressor T cells.
 Transplant. Rev. 26: 170 (1975)

47. GERSHON,R.K. Factors controlling concomitant immunity
CARTER,R.L. in tumor-bearing hamsters: effects of
 prior splenectomy and tumor removal.
 J. Natl. Cancer Inst. 43: 533 (1969)

48. GERSHON,R.K. Mechanism by which the spleen may act in
KONDO,K. regulating tumor immunity after tumor re-
section.
J. Natl. Cancer Inst. 43: 545 (1969)
49. GERSHON,R.K. Activation of suppressor T-cells by tumour
MOKYR,M.B. cells and specific antibody.
MITCHELL,M.S. Nature V.250 No.5467: 594 (1974)
50. GERSHON,R.K. Immunoregulatory role of spleen locali-
LANCE,E.M. zing thymocytes.
KONDO,K. J. Immunol. 112: 546 (1974)
51. GOLUB,S.G. Correlation of in vivo and in vitro assays
O'CONNELL,T.X. of immunocompetence in cancer patients.
MORTON,D.L. Cancer Res. 34: 1833 (1974)
52. GORCZYNSKI,R.M. Immunity to murine sarcoma virus-induced tu-
mors: II. Suppression of T-cell-mediated im-
munity by cells from progressor animals.
J. Immunol. 112.5: 1826 (1974)
53. GOWANS,J.L. Lymphocytes.
The Harvey Lectures Series 64: 87 (1968-69)
54. GREAVES,M.F. T- and B-lymphocytes. Origin, properties and
OWEN,J.J.T. roles in immune responses.
RAFF,M.C. Excerpta Medica. Amsterdam 1973
55. GUTMANN,G. Homing properties of thymus-independent
WEISSMANN,I. follicular lymphocytes.
Transplantation 16: 621 (1973)

56. HAIM,S. Chronic pyoderma in splenectomized patient.
SEGAL,B. Dermatologica 159: 251 (1979)
57. HALLIDAY,W.J. Leucocyte adherence inhibition and specific
MALUISH,A.E. immunoreactivity in malignant melanoma.
LITTLE,J.H. Int. J. Canc. 16: 643 (1975)
DAVIS,N.C.
58. HAN,T. Depression of T-lymphocyte response by non-
TAKITA,H. T suppressor cells in lung cancer patients.
Cancer 44.6: 2090 (1979)
59. HARDING,B. The distribution of antibody and antibody-
MAC LENNAN,I.C. producing cells after immunization with
xenogeneic cells.
Immunology 23: 35 (1972)
60. HEHLMANN,R. Biochemical studies on RNA tumor virus in-
ERFLE,V. formation and its transmission in B₁₆-murine
melanoma.
Int. J. Cancer 22: 630 (1978)
61. HELLSTRÖM,K.E. Lymphocyte mediated cytotoxicity and block-
HELLSTRÖM,I. ing serum activity to tumor antigens.
Adv. Immunol. 18: 209 (1974)
62. HELLSTRÖM,I. Tumor-enhancing suppressor activator T cells
HELLSTRÖM,K.E. in spleens and thymuses of tumor immune mice
BERNSTEIN,I.D. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 76.10: 5294 (1979)
63. HELLSTRÖM,I. Serum mediated inhibition of cellular immu-
HELLSTRÖM,E.E. nity to methylcholanthrene induced sarcomas.
SJÖGREN,H.O. Cell. immunol. 1: 18 (1970)

64. HERBERMAN,R.B. Cell-mediated immunity to tumor cells.
Adv. Canc. Res. 19: 207 (1974)
65. V.HERRATH,E. Bau und Funktion der normalen Milz.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1958
66. HILDEMAN,W.H. The Syrian hamster in immunologic perspective.
Federation Proc. 37.7: 2102 (1978)
67. HILL,H.Z. Effects of 5-(3,3-Dimethyl-1-triazeno)imida-
HILL,G.J. zole-4-carboxamide,1-(2-Chloroethyl)-3-(4-
MILLER,C.L. methylcyclohexyl)-1-nitroso-urea, and L-
PFALLER,M. Phenylalanine Mustard on B₁₆, Cloudman S91,
WEISS,K. and Harding-Passey Mouse Melanomas.
GALIN,M. Canc. Res. 39: 934 (1979)
68. HUNNINGHAKE,G. Suppression of the generation of human ConA-
FANCI,A.S. induced cytotoxic effector cells by ConA-
activated suppressor cells.
J. Immunol. 120: 1828 (1978)
69. IHDE,D.C. Splenectomy in the chronic phase of chronic
CANELLOS,G.P. granulocytic leukemia, effects in 32 pa-
SCHWARTZ,J.H. tients.
DEVITA,V.T. Ann. Intern.Med. 84: 17 (1976)
70. ILFELD,D. In vitro cytotoxicity and in vivo tumor en-
CARNAUD,C. hancement induced by mouse spleen cells au-
COHEN,I.R. tosensitized in vitro.
TRAININ,N. Int.J. Cancer 12: 213 (1973)

71. ISAKOV,N. An immunoregulatory factor associated with
SEGAL,S. spleen cells from tumor-bearing animals.
HOLLANDER,N. I. Effect on tumor growth and antibody pro-
FELDMAN,M. duction.
Int.J. Cancer 22: 465 (1978)
72. JANIK,P. Cell proliferation during immunologic per-
STEEL,G.G. turbation in three transplanted tumors.
Brit.J. Cancer 26: 108 (1972)
73. KAKIMOTO,K. Further characterization of the suppressor
FUJI,H. cells, activated by goat anti-Th-B antibody
GROSSBERG,A.L. reagent and responsible for enhanced growth
PRESSMAN,D. of sarcoma 180 in AKR-mice.
Cell. Immunol. 37: 61 (1978)
74. KALISS,N. Dynamics of immunologic enhancement.
Transplant. Proc. 2: 59 (1970)
75. KALISS,N. Immunological enhancement of tumor homo-
grafts in mice; a review.
Cancer Res. 18: 992 (1958)
76. KALISS,N. Immunological enhancement.
Int.Rev. Exp. Path. 8: 241 (1969)
77. KHAITOV,R.M. Stem cells and T and B lymphocytes during
PETROV,R.V. tumor growth.
GAMBAROV,S.S. Cell. Immunol. 22: 1 (1976)
NORIMOV,A.S.
BLINOV,V.A.

78. KIRCHNER, H. Inhibition of proliferation of lymphoma
MUCHMORE, A.V. cells and T-lymphocytes by suppressor
CHUSED, T.M. cells from spleens of tumor-bearing mice.
HOLDEN, H.T. J.Immunol. 114: 206 (1975)
HERBERMAN, R.B.
79. KLAUE, P. Incidental splenectomy: Early and late
ECKERT, E. postoperative complications.
KERN, E. American J. Surgery 138: 296 (1979)
80. KLOBUSICKA, M. Kinetics of thymus- and bone marrow-de-
KALAFUT, F. rived lymphocytes in rats during tumor
NOVOTNA, L. growth.
Neoplasma 24.6: 583 (1977)
81. KRÄUSSLICH, H. Selektionsversuch auf Phagozytosevermö-
MEYER, J. gen mit Mäusen.
RADZIKOWSKI, A. Z.Tierzüchtg. Züchtgsbiol. 92: 17 (1975)
BUSCHMANN, H.
OSTERKORN, K.
82. LAW, L.W. Studies of soluble transplantation and
APPELLA, E. tumor antigens.
(eigene Literatur) 1977
83. LENNERT, K.A. Splenektomie-bedingte Spätveränderungen.
SAENGER, M.D. Münch.Med.Wschr. 111: 190 (1969)
MONDORF, W.
84. LIDEN, S. Bone marrow cell migration to peripheral
LINNA, T.J. lymphnodes and skin in contact allergic gui-
nea pigs.
Int.Arch. Allergy 35: 47 (1969)

85. LINNA,T.J. Cell migration from the bone marrow to the
LIDEN,S. spleen in young guinea pigs.
Int. Arch. Allergy 35: 35 (1969)
86. LOZZIO,B.B. Hematopoiesis in congenitally asplenic
mice.
American J. Physiology 222: 290 (1972)
87. LOZZIO,B.B. Immune competence of hereditarily asplenic
WARGON,L.B. mice.
Immunology 27: 167 (1974)
88. MANOR,Y. Transition from T cell protection to T cell
TREVES,A.J. enhancement during tumor growth in an allo-
COHEN,I.R. geneic host.
FELDMANN,M. Transplant. 22.4: 360 (1976)
89. MARTIN,W.J. Naturally occurring cytotoxic anti-tumor
MARTIN,S.E. reactive antibodies directed against C-
type viral envelope antigens.
Nature 256: 498 (1975)
90. MARTZ,E. Early steps in specific tumor cell lysis by
sensitized mouse T-lymphocytes, I. Resolu-
tion and characterisation.
J. Immunol. 115: 261 (1975)
91. MARTZ,E. Multiple target cell killing by the cyto-
BENACERRAF,B. lytic T-lymphocyte and the mechanism of
cytotoxicity.
Transplantation 21: 5 (1976)

92. MEYER, J. Variationsursachen der Phagozytoseaktivität bei Mäusen.
KRÄUSSLICH, H.
RADZIKOWSKI, A. Z.Tierzüchtg.Züchtgsbiol. 90: 94 (1973)
BUSCHMANN, H.
OSTERKORN, K.
93. MEYER, J. Untersuchungen an Mäusen, welche auf hohes
RADZIKOWSKI, A. und niedriges Phagozytosevermögen selektiert worden sind.
BUSCHMANN, H.
KRÄUSSLICH, H. Z.Tierzüchtg.Züchtgsbiol. 95: 52 (1978)
OSTERKORN, K.
94. MEYER, J. Selection on phagocytic activity.
KRÄUSSLICH, H. (personal comm. 1978)
BUSCHMANN, H.
95. MIKULSKA, T.B. Evidence for an immunological reaction of
SMITH, C. the host directed against its own actively growing primary tumor.
ALEXANDER, P. J. Natl. Canc. Inst. 36: 29 (1966)
96. MILAS, L. The effect of splenectomy on fibrosarcoma "metastases" in lungs of mice.
MUJAGIC, H. Int.J. Cancer 11: 186 (1973)
97. MINTZ, U. Splenectomy as initial therapy in twenty-six patients with leukemic reticuloendotheliosis (hairy cell leukemia)
GOLOMB, H.M. Cancer Res. 39: 2366 (1979)
98. MÖLLER, E. Interaction between tumor and host during progressive neoplastic growth in histoincompatible recipients.
J. Natl. Canc. Inst. 35: 1053 (1965)

99. MÖLLER,G. The concept of immunological surveillance
MÖLLER,E. against neoplasia.
Transplant.Rev. 28: 3 (1976)
100. NACHTIGAL,D. The role of specific suppressor T-cells in
ZAN-BAR,I. immune tolerance.
Transplant. Rev. 26: 87 (1975)
101. NELSON,D.S. Macrophages and lymphoid tissues in mice
KEARNEY,R. with concomitant tumour immunity.
Brit.J. Cancer 34: 221 (1976)
102. NINNEMANN,J.L. Melanoma-associated immunosuppression
 through B-cell activation of suppressor T-
 cells.
J. Immunol. 120: 1573 (1978)
103. NORDLUND,J.J. Splenic regulation of the clinical appea-
GERSHON,R.K. rance of small tumors.
J. Immunol. 114.5: 1486 (1975)
104. OLD,L.J. Antigenic properties of chemically in-
BOYSE,E.A. duced tumors.
CLARKE,D.A. Ann.New York Acad. Sci. 101: 80 (1962)
CARSWELL,E.A.
105. OLD,L.J. Effect of prior splenectomy on the growth
CLARKE,D.A. of sarcoma 180 in normal and BCG infected
BENACERRAF,B. mice.
STOCKERT,E. Experientia 18: 335 (1962)

106. ORITA,K. Effect of splenectomy in tumor-bearing
KONAGA,E. mice and gastric cancer patients.
OKADA,T. Gann 68: 731 (1977)
KUNISADA,K.
YUMURA,M.
TANAKA,S.
107. POLLACK,S.B. Effect of host sex and splenectomy on
Moloney virus-induced sarcomas.
Int.J. cancer 8: 264 (1971)
108. POPE,B.L. Two distinct populations of suppressor
WHITNEY,R.B. cells in the spleens of mice bearing
LEVY,J.G. methylcholanthrene-induced tumors.
J. Immunol. 120.6: 2033 (1978)
109. POPE,B.L. Suppressor cells in the spleens of tumor-
WHITNEY,R.B. bearing mice: enrichment by centrifugation
LEVY,J.G. on Hypaque-Ficoll and characterization of
KILBURN,D.G. the suppressor population.
J. Immunol. 116.5: 1342 (1976)
110. PREHN,R.T. Immunosurveillance, regeneration and onco-
genesis.
Prog.Exp.Tumor Res. 14: 1 (1971)
111. PREHN,R.T. Immunity to methylcholanthrene-induced
MAIN,J.M. sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 18: 769 (1957)
112. RAFF,M.C. Thymus derived lymphocytes: their distri-
OWEN,J.J.T. bution and role in the development of peri-
pheral lymphoid tissues of the mouse.
Europ.J. Immunol. 1: 27 (1971)

113. RICH,R.R.
PIERCE,C.W. Biological expressions of lymphocyte activation. III. Suppression of plaque-forming cell responses in vitro by supernatant fluids from concanavalin A-activated spleen cell cultures.
J. Immunol. 112: 1360 (1974)
114. RIOS,A.
SIMMONS,R.L. Immunospecific regression of various syngeneic mouse tumors in response to neuraminidase treated tumor cells.
J.Nat. Cancer Inst. 51: 637 (1973)
115. ROWLEY,D.A. The effect of splenectomy on the formation of circulating antibody in the adult male albino rat.
J. Immunol. 64: 289 (1950)
116. RUCO,L.
MELZER,M. Macrophage activation for tumor cytotoxicity.
J. Immunol. 120: 1054 (1978)
117. SANTOLI,D.
KOPROWSKI,H. Mechanisms of activation of human natural killer cells against tumor and virus infected cells.
Immunol. Rev. 44: 125 (1979)
118. SAVARY,C.A.
LOTZOVA,E. Suppression of natural killer cell cytotoxicity by splenocytes from corynebacterium parvum-injected, bone marrow tolerant and infant mice.
J. Immunol. 120.1: 239 (1978)

119. SCHECHTER,B. Generation of suppressor lymphocytes during
 SEGAL,S. sensitization in culture against a syngen-
 FELDMAN,M. eic tumor: affinity chromatography on in-
 solubilized histamine.
 J. Immunol. 120.4: 1268 (1978)
120. SCHECHTER,B. Enhancing lymphocytes in spleens of tumor-
 SEGAL,S. bearing mice: affinity chromatography on
 FELDMAN,M. insolubilized histamine.
 Int.J. Cancer 20: 239 (1977)
121. SCHIMMING,I. Serum antibodies against B₁₆-Melanoma.
 ERFLE,V. (personal comm.)
122. SJÖGREN,H.O. Studies on specific transplantation resis-
 tance to polyoma-virus-induced tumors.
 IV.Stability of the polyoma cell antigen.
 J. Natl. Cancer Inst. 32: 661 (1964)
123. SJÖGREN,H.O. Suggestive evidence that the "Blocking an-
 HELLSTRÖM,I. tibodies" of tumor-bearing individuals may
 BANSAL,S.C. be antigen-antibody complexes.
 HELLSTRÖM,K.E. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 68.6: 1372 (1971)
124. SKAMENE,E. Increased phagocytic activity of splenec-
 CHAYASIRISOB- tomized mice challenged with *Listeria*
 HON,W. monocytogenes.
 KONSHAVN,P.A. Immunology 34: 901 (1978)
125. SLAVIN,S. The role of the spleen in tumor growth ki-
 MORECKI,S. netics of the murine B-cell leukemia (BCL₁).
 WEISS,L. J. Immunol. 124.2: 586 (1980)

126. SPELLMANN,C.W. Modification of immunological potential by
DAYNES,R.A. ultraviolet radiation. II. Generation of
suppressor cells in short-term UV-irradiated mice.
Transplant. 24.2: 120 (1977)
127. SUBRAMANIAN,C. Soluble suppressor factor from the spleen
YU,S. of tumor-bearing mice.
MC KHANN,C.F. Cancer Res. 38: 1996 (1978)
128. SY,M.S. Splenic requirement for the generation of
MILLER,S.D. suppressor T-cells.
KOWACH,H.B. J. Immunol. 119: 2095 (1977)
CLAMAN,H.N.
129. TREVES,A.J. Enhancing T-lymphocytes from tumor-bearing
CARNAUD,C. mice suppress host resistance to a syngeneic tumor.
TRAININ,N.
FELDMAN,M. Europ.J. Immunol. 4: 722 (1974)
COHEN,I.R.
130. TWOMEY,J.J. Hodgkin's disease. An immunodepleting and
LAUGHTER,A.H. immunosuppressive disorder.
FARROW,S. J.Clin.Invest. 56: 467 (1975)
DOUGLASS,C.C.
131. WALDMANN,T.A. The role of suppressor cells in the patho-
BRODER,S. genesis of common variable hypogammaglobu-
KRAKAUER,R. linemia and the immunodeficiency associated
MACDERMOTT,R.P. with myeloma.
DURM,M. Fed.Proc. 35: 2067 (1976)
GOLDMAN,C.
MEADE,B.

132. WANG,B.S. In vivo effects and parallel in vitro cyto-
STEELE,G. toxicity of splenocytes harvested from treat-
MANNICK,J.A. ed or control C57 BL/6J-mice after adjuvant
FALLON,M. immunotherapy of pulmonary metastases using
ONIKUL,S.R. xenogeneic RNA-specific to B₁₆ murine melano-
ma.
Cancer Res. 39: 1702 (1979)
133. WEISSMANN,I.L. The lymphoid system: Its normal architecture
WARNKE,R. and the potential for understanding the sys-
BUTCHER,E.C. tem through the study of lymphoproliferative
ROUSE,R. diseases.
LEVY,R. Human Pathology 9.1: 25 (1978)
134. WITTING,C.H. Effect of splenectomy on B- and T-lymphocy-
HULTSCH,E. tes and a Benzpyrene-induced murine sarcoma.
Z. Krebsforschung 92: 267 (1978)
135. YAGELLO,M. Antibody production by spleen cells of mice
LESPINATS,G. bearing MCA-induced tumours: Search for sup-
FRIDMAN,W.H. pressor cells.
Int.J. Cancer 22: 136 (1978)

DANKSAGUNG

Herrn Prof.Dr.med.Dr.h.c. W. Brendel danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Betreuung und die Verfügungstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Chirurgische Forschung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.med.Dr.med.vet.C. Hammer für zahlreiche Ratschläge und Unterstützung bei den Experimenten.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof.Dr.med.vet.J. Meyer vom Institut für Tierzucht und Tierhygiene für seine Hilfe und für die Überlassung der Versuchstiere und Herrn Dr. W. Permanetter vom Pathologischen Institut für die histologischen Untersuchungen danken.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes, besonders Frä. H. Bayer, Frä. A. Allmeling und Frä. E. Doischer danke ich für ihre tätige Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Frä. G. Höbel danke ich für ihre Hilfe beim Fertigstellen der Abbildungen.

Frä. I. Moll danke ich für das sorgfältige Schreiben der Arbeit.

Außerdem danke ich den Tierpflegern für die sorgfältige Betreuung der Versuchstiere.

CURRICULUM VITAE

Hubertus, Hans, Gideon,
Herbert v.Wallenberg
Pachaly
geb. 31.1.53 in Bad Cannstatt,
Stuttgart als Sohn des Dipl.-
Volkswirts Peter v.Wallenberg
Pachaly und seiner Ehefrau Reta,
geb. v.Langen.

Schulbildung: Volksschule in Stuttgart 1959-60
Volksschule in Dortmund 1960-63
Max-Planck-Gymnasium Dortmund
1963-66
Landschulheim Schondorf 1966-72
Abitur 1972

Militärdienst: Grundwehrdienst und Reserve-
offizierausbildung beim Fern-
meldelehrbataillon Starnberg/
Maxhof 1972-74

Studium: Studium der Humanmedizin:
Universität des Saarlandes
1974-75
Ludwig-Maximilians-Universität
München 1975-81
Approbation als Arzt 1981
Doktorand am Institut für
chirurgische Forschung 1977-81

